



Université de Montréal

Caractérisation et évaluation de la virulence de souches cliniques de  
*Clostridium perfringens* chez le poulet à griller élevé sans antibiotique.

par

ERIC PARENT

Département de sciences cliniques

Faculté de médecine vétérinaire

Mémoire présenté à la Faculté de médecine vétérinaire  
en vue de l'obtention du grade de  
*Maître ès sciences* (M.Sc.)  
en sciences vétérinaires  
option sciences cliniques

Août 2015

©Eric Parent, 2015

## Résumé

Cette étude a développé un nouveau modèle aviaire de ligatures intestinales en boucles pour évaluer la virulence de souches de *Clostridium perfringens* causant l'entérite nécrotique chez le poulet. Des souches de *C. perfringens* caractérisées à partir d'une banque d'isolats récupérés de poulets à chair élevés sans antibiotique de fermes avec et sans problèmes d'entérite nécrotique ont été utilisées. La caractérisation des isolats de ces deux fermes a montré une faible diversité génétique parmi la ferme avec problèmes d'entérite nécrotique, alors que les isolats récupérés de la ferme sans entérite nécrotique a montré une haute diversité génétique. La détection de gènes de toxines a montré une prévalence de 95% pour le gène *netB* et 79% pour le gène *cpb2* dans la ferme avec entérite nécrotique alors qu'elle était de 0% pour *netB* et 25% pour *cpb2* dans la ferme sans entérite nécrotique. Dans le modèle de ligatures en boucles intestinales, les trois souches provenant de la ferme avec entérite nécrotique ont induit des lésions d'entérite nécrotique, alors que la souche provenant de la ferme sans entérite nécrotique a été incapable de reproduire l'entérite nécrotique. De plus, une souche *netB* négative et *cpb2* positive provenant de la ferme avec entérite nécrotique a induit des lésions d'entérite nécrotique. Une association positive a aussi été observée entre la présence de lésions sévères et la localisation de larges bâtonnets à Gram-positif sur la muqueuse intestinale, suggérant que l'adhésion de *C. perfringens* à la muqueuse intestinale pourrait être importante dans la pathogénèse de l'entérite nécrotique. Ce modèle peut être utilisé pour étudier la virulence des souches de *C. perfringens*, en plus de montrer un fort potentiel pour étudier les interactions hôte-pathogène dans l'entérite nécrotique. Finalement, cette étude a montré que *netB* est un facteur de virulence important pour *C. perfringens*, mais non essentiel pour causer des lésions d'entérite nécrotique.

**Mots-clés :** Poulet, entérite nécrotique, *Clostridium perfringens*, modèle expérimental, toxine NetB, diversité génétique, sans antibiotique.

## Abstract

This study developed a new avian intestinal ligated loop model to evaluate *C. perfringens* pathogenicity in chicken necrotic enteritis. *C. perfringens* strains were selected and characterized from a culture collection recovered from broiler chickens raised without antibiotic in farms with and without necrotic enteritis. Strain characterization showed a low genetic diversity in flocks with necrotic enteritis and genetic diversity was high in flocks without necrotic enteritis. Toxin gene detection showed a prevalence of 95% for *netB* and 79% for *cpb2* in the farm with necrotic enteritis while prevalence was 0% for *netB* and 25% for *cpb2* in the farm without necrotic enteritis. In the intestinal ligated loop model, the 3 strains recovered from the farm with necrotic enteritis produced necrotic enteritis lesions and the strain recovered from the farm without necrotic enteritis did not induce necrotic enteritis lesions. Also, a *netB* negative and *cpb2* positive strain from the farm with necrotic enteritis induced lesions of necrotic enteritis. A positive association was also observed between severe necrotic enteritis lesions and the localization of large Gram-positive rods on intestinal mucosa, suggesting *C. perfringens* adherence to intestinal mucosa might be important in the pathogenesis of necrotic enteritis. This model can be used to study the virulence of *C. perfringens* strains while showing a high potential to study host-pathogen interactions in chicken necrotic enteritis. Finally, this study showed that *netB* can be an important factor in necrotic enteritis, but not essential to cause lesions of necrotic enteritis in chickens.

**Keywords:** Chicken, necrotic enteritis, *Clostridium perfringens*, experimental model, NetB toxin, genetic diversity, antibiotic-free.

## Table des matières

<b>Résumé</b> .....	ii
<b>Abstract</b> .....	iii
<b>Table des matières</b> .....	iv
<b>Liste des tableaux</b> .....	vi
<b>Liste des figures</b> .....	vii
<b>Liste des sigles et abréviations</b> .....	viii
<b>Remerciements</b> .....	ix
<b>Introduction</b> .....	1
<b>Chapitre 1. Recension de la littérature</b> .....	5
1. <i>Clostridium perfringens</i> .....	5
1.1 Description de la bactérie .....	5
1.2. Le toxinotypage .....	6
1.3 Les toxines.....	7
1.4 La régulation de la production de toxines .....	13
1.5 La production de bactériocines .....	16
2. L'entérite nécrotique .....	19
2.1 Étiologie .....	19
2.2 Impacts économiques sur l'élevage de poulets sans antibiotique .....	21
2.3 Voies de transmissions .....	22
2.4 Facteurs de risques .....	24
2.5 Pathogénie .....	27
2.6 Signes cliniques.....	28
2.7 Lésions macroscopiques.....	29
2.8 Lésions microscopiques .....	29
2.9 Chronologie du développement des lésions microscopiques.....	30
2.10 Diagnostic.....	31
2.11 Traitement .....	32
2.12 Prévention.....	33
3. Les modèles d'études <i>in vivo</i> de l'entérite nécrotique.....	38

<b>Chapitre 2. Article</b> .....	43
Abstract.....	44
Introduction .....	46
Materials and Methods .....	48
Results .....	56
Discussion.....	59
Acknowledgments .....	65
References .....	65
Figures .....	68
Tables.....	76
<b>Discussion</b> .....	79
<b>Conclusion</b> .....	93
<b>Bibliographie</b> .....	95
<b>Annexe 1</b> .....	x
<b>Annexe 2</b> .....	xi

## Liste des tableaux

### Chapitre 1.

Tableau I. Classification des toxinotypes de <i>C. perfringens</i> selon les toxines majeures produites.....	6
Tableau II. Principales maladies associées aux toxinotypes de <i>C. perfringens</i> .....	7
Tableau III. Antibiotiques homologués en 2015 au Canada pour le traitement de l'entérite nécrotique.....	33
Tableau IV. Antibiotiques homologués en 2015 dans la moulée au Canada pour la prévention de l'entérite nécrotique .....	34
Tableau V. Anticoccidiens ajoutés à la moulée homologués au Canada en 2015 pour la prévention de la coccidiose chez le poulet à griller .....	35
Tableau VI. Vaccins homologués au Canada en 2015 pour l'immunisation des poulets contre la coccidiose.....	37

### Chapitre 2.

Table 1. Number of isolates recovered per sampled flock over the four consecutive production periods. ....	76
Table 2. Description of <i>C. perfringens</i> strains selected for the intestinal ligated loop model.....	76
Table 3. Microscopic lesions scoring system. ....	77
Table 4. Description of large Gram-positive rods observed by microscopic evaluation of the intestinal loops. ....	78

## Liste des figures

Chapitre 2.

Figure 1. Intestinal ligated loop design for 1 chicken.....	68
Figure 2. Loop injected with strain 39d. Total histological scores based on the addition of 6 histological changes.....	69
Figure 3. Dendrogram of the 12 different PFGE profiles from the 94 typed isolates obtained by unweighted pair group using arithmetic averages with a Dice coefficient and 1.5% band position tolerance.....	70
Figure 4. <i>C. perfringens</i> clones distribution in the 4 consecutive flocks of the NE+ farm.....	71
Figure 5. <i>C. perfringens</i> clones distribution in the 4 consecutive flocks of the NE- farm.....	72
Figure 6. Average total lesion scores of the intestinal ligated loop experiment for each inoculated <i>C. perfringens</i> strain.....	73
Figure 7. Average total lesion scores of the intestinal ligated loop experiment by the localization of the bacteria observed at histopathology.....	74
Figure 8. Histological lesions of necrotic enteritis 7 hours post-infection produced by various <i>C. perfringens</i> strains in the intestinal ligated loop model.....	75



## Liste des sigles et abréviations

$\alpha$	alpha
$\beta$	bêta
$\varepsilon$	epsilon
$\iota$	iota
BHI	Brain heart infusion (infusion coeur cerveau)
CFU	Colony forming unit (colonie formatrice d'unités)
<i>C. perfringens</i>	<i>Clostridium perfringens</i>
DNA	Deoxyribonucleic acid (acide désoxyribonucléique)
EDTA	Ethylenediaminetetraacetic acid
NE+ farm	Farm with necrotic enteritis (ferme avec entérite nécrotique)
NE- farm	Farm without necrotic enteritis (ferme sans entérite nécrotique)
NetB	Necrotic enteritis B-like toxin
PCR	Polymerase chain reaction (réaction de polymérisation en chaîne)
PFGE	Pulsed field gel electrophoresis (électrophorèse à champs pulsés)
SE	Salt-EDTA
TAQ	<i>Thermus aquaticus</i>
TBE	Tris-Borate-EDTA
TE	Tris-EDTA
Tris	Trishydroxymethylaminomethane

## Remerciements

Je tiens à remercier Dre Martine Boulianne, directrice, ainsi que Dre Marie Archambault, co-directrice, pour m'avoir permis de réaliser ce projet de recherche. Ces deux dernières années furent très enrichissantes grâce à vos nombreux conseils sur tous les aspects entourant l'enseignement et la recherche aux études graduées. J'ai apprécié la complicité que nous avons développée au cours de ma maîtrise et j'ai adoré tous les moments passés ensemble. Je vous suis reconnaissant la qualité de votre enseignement, qui me sera assurément utile dans le futur.

Je tiens également à remercier toutes les personnes de la Chaire en recherche avicole ainsi que du Laboratoire en antibiorésistance pour leur aide tout au long de mon projet, spécialement Audrey Charlebois qui fut un mentor exceptionnel dans mon apprentissage des techniques en laboratoire. J'aimerais aussi remercier tous mes assistants chirurgiens sans qui les infections expérimentales auraient été impossibles.

Je remercie les organismes subventionnaires tels que la Chaire en recherche avicole ainsi que le CRSNG pour leur contribution dans la réalisation de ce projet.

Finalement, je tiens à remercier ma famille et mes proches pour leur soutien au cours de mes études.

## Introduction

La production de poulets destinés à la consommation a changé au travers des époques. Autrefois axée vers une production à petite échelle et locale, la production avicole s'est organisée au cours des années 1940-1960. Une production hautement efficace a fait son apparition avec la création de poulaillers à grandes surfaces, de couvoirs, de meuneries et d'abattoirs (NCC, 2012b). Combinée à l'amélioration génétique, l'amélioration de l'alimentation, le développement de technologies et la mécanisation, l'industrie avicole est devenue performante. Dans un but de maximiser la croissance des poulets à griller, l'utilisation d'antibiotiques comme promoteurs de croissance a fait son apparition pendant l'ère d'industrialisation suite à la deuxième guerre mondiale. En effet, des travaux de l'époque ont montré une amélioration de la croissance avec l'utilisation d'antibiotiques pendant l'élevage de poulets (Jukes *et al.*, 1956; Moore *et al.*, 1946) et cette pratique s'est rapidement répandue. Actuellement, l'élevage conventionnel de poulets de chair mise sur cette utilisation d'antibiotiques pour contrôler les flores microbiennes intestinales et ainsi améliorer l'efficacité alimentaire (Dibner & Richards, 2005). L'effet de ces antibiotiques serait aussi lié à la diminution d'agents opportunistes susceptibles de provoquer des infections cliniques et sous-cliniques (Dibner & Richards, 2005). Combinée à l'utilisation d'anticoccidiens, cette utilisation d'antibiotiques permet un contrôle efficace des problèmes entériques et des infections secondaires reliées à une mauvaise santé intestinale dans les élevages avicoles conventionnels. Par contre, l'utilisation à grande échelle et en continu d'antibiotiques chez les animaux de consommation n'est pas sans conséquence. En effet cette pratique

est de plus en plus questionnée et la résistance des bactéries aux antibiotiques est un phénomène qui inquiète à la fois les intervenants du milieu avicole, les experts en santé publique et les consommateurs. Des rapports datant de la période du début de l'utilisation d'antibiotiques comme promoteurs de croissance relatent des cas de résistance bactérienne aux antibiotiques (Elliott & Barnes, 1959) ou expriment leurs inquiétudes face à la menace de l'antibiorésistance (Manten, 1963). Déjà à cette époque, les mécanismes de résistance bactérienne sont un sujet de discussion parmi la communauté scientifique.

À l'heure actuelle, l'utilisation des antibiotiques en production avicole est toujours d'actualité. Les bactéries isolées des fèces de volailles montrent souvent de forts taux de résistance aux antibiotiques. Par exemple, une étude réalisée sur la résistance antimicrobienne d'*Enterococcus faecalis* et d'*Enterococcus faecium* dans les caeca de poulets et de dindes à l'abattoir a identifié un patron de résistance à plusieurs antibiotiques, soit la bacitracine, l'érythromycine, la lincomycine, la quinupristine-dalfopristine, la tétracycline et la tylosine (Tremblay *et al.*, 2011). Dans cette étude, les taux de résistance envers la bacitracine, largement utilisée dans la moulée pour prévenir l'entérite nécrotique, était de 88.1% et 94% pour respectivement *E. faecalis* et *E. faecium* isolés chez les troupeaux de poulets et de dindes au Canada. Ces bactéries étant ubiquitaires dans le tractus gastro-intestinal des espèces avicoles, elles sont de bons indicateurs pour évaluer l'antibiorésistance chez les poulets. Dans une autre étude, une corrélation positive a été mesurée entre l'administration d'antibiotiques aux volailles et la résistance bactérienne à ces mêmes antibiotiques (El-Rami *et al.*, 2012). Des experts en santé publique d'organisations telle la *Food and Agriculture Organization of the United*

*Nation* (FAO) se préoccupent de ces résultats car la santé humaine pourrait être affectée par la dissémination d'un agent pathogène ayant acquis des caractères de résistance aux antibiotiques (Hughes & Heritage, 2004). Il est proposé d'utiliser des alternatives à ces promoteurs de croissance antimicrobiens, soit en améliorant les conditions de santé générale des troupeaux ou en utilisant des produits alternatifs (Hughes & Heritage, 2004).

À la lumière de ces travaux sur la résistance bactérienne reliée à l'utilisation des antibiotiques en élevage, les consommateurs demandent de plus en plus une viande provenant d'animaux n'ayant reçu aucun promoteur de croissance, voire aucun antibiotique. Par exemple, McDonald's USA<sup>®</sup>, un géant de l'alimentation, exigera de ses fournisseurs d'ici 2017 des poulets n'ayant reçu aucun antibiotique ayant une importance pour la médecine humaine (Baertlein & Huffstutter, 2015). Dans la même optique, l'élevage de poulets sans antibiotique a fait son apparition pour réduire la pression sur l'antibiorésistance et pour combler une demande des consommateurs. Au Canada, cette étiquette implique que l'animal n'a reçu aucun antibiotique ni anticoccidien depuis sa naissance jusqu'à son abattage (CFIA, 2011; NCC, 2012a).

Une étude réalisée par la Chaire en Recherche Avicole de l'Université de Montréal a examiné les impacts économiques et sur la santé des oiseaux d'une production commerciale de poulets de chairs élevés sans antibiotique comparée à la production avicole conventionnelle (Gaucher *et al.*, 2015). Malgré la démonstration qu'il est possible de produire des poulets à chair élevés sans antibiotique, les performances zootechniques et économiques étaient en deçà de celles mesurées dans les troupeaux élevés avec antibiotiques. Les principaux problèmes étaient reliés à l'entérite nécrotique, causée par la bactérie *C. perfringens* (Bernier *et al.*, 1977; Timbermont, Lanckriet,

Gholamiandehkordi, *et al.*, 2009). Alors que certaines fermes sans antibiotiques n'ont montré aucun signe clinique d'entérite nécrotique, d'autres ont eu des problèmes récurrents dans plusieurs lots consécutifs d'entérite nécrotique sous-clinique et clinique, où cette dernière a causé de lourdes pertes économiques dans les troupeaux affectés. Jusqu'à maintenant dans la littérature, il n'y a pas d'information sur la diversité et la virulence des souches de *C. perfringens* retrouvées dans plusieurs lots consécutifs de poulets à chair élevés sans antibiotiques.

L'objectif principal du projet était donc d'investiguer les causes d'entérite nécrotique chez des troupeaux consécutifs de poulets à griller élevés sans antibiotique dans une même ferme. La comparaison de troupeaux avec et sans entérite nécrotique était essentielle pour mettre en évidence les divergences entre la diversité génétique et la virulence des souches de *C. perfringens* issues de ces troupeaux avec différents profils cliniques.

## Chapitre 1. Recension de la littérature

### 1. *Clostridium perfringens*

#### 1.1 Description de la bactérie

*Clostridium perfringens* est une bactérie à Gram-positif relativement large, non motile, anaérobie et en forme de bâtonnet (Morris & Fernandez-Miyakawa, 2009; Wells & Wilkins, 1996). Elle forme des spores en milieu aérobie, mais elle est tolérante dans les milieux microaérophiles (Morris & Fernandez-Miyakawa, 2009; Wells & Wilkins, 1996). Elle est ubiquitaire dans le sol, l'environnement et dans la flore microbienne intestinale des humains et des animaux (Wells & Wilkins, 1996). Elle peut aussi être retrouvée sur la viande destinée à la consommation humaine (Nowell *et al.*, 2010) et ainsi causer des toxi-infections alimentaires (Wells & Wilkins, 1996).

*C. perfringens* est une bactérie mésophile, c'est-à-dire qu'elle croît dans un milieu tempéré entre 25°C et 40°C. De nombreux milieux d'enrichissement peuvent être utilisés. Il est important qu'ils soient riches en hydrates de carbone car la bactérie les fermente pour produire du dioxyde de carbone et de l'hydrogène (Morris & Fernandez-Miyakawa, 2009). Cela est essentiel pour maintenir un environnement anaérobie. Parmi les milieux d'enrichissement les plus communément utilisés, il y a le *commercial cooked meat medium*, le *brain heart infusion* et le *tryptone glucose yeast* (Fernandez-Miyakawa *et al.*, 2007). Suite à une inoculation dans le milieu d'enrichissement, une incubation en milieu anaérobie pendant 24h est nécessaire. Pour isoler des colonies, les géloses d'agar avec 5% de sang sont communément utilisées. Les colonies de *C. perfringens* produisent une hémolyse  $\alpha$  et une hémolyse  $\beta$ , soit une double hémolyse caractéristique permettant de les identifier sur ce type de géloses d'agar.

## 1.2. Le toxinotypage

*C. perfringens* est divisé en cinq toxinotypes (A, B, C, D et E) selon la combinaison de la production par la bactérie de quatre exotoxines majeures ( $\alpha$ ,  $\beta$ ,  $\epsilon$ ,  $\iota$ ) lors de la phase exponentielle de croissance (Cavalcanti *et al.*, 2004; Petit *et al.*, 1999). Le tableau I illustre le classement des différentes souches de *C. perfringens* selon chaque toxine majeure produite. Les toxines produites étant différentes, les toxinotypes ne produiront pas les mêmes maladies et ils n'affecteront pas les mêmes espèces. Ainsi, il est reconnu que seuls les types A et C causent l'entérite nécrotique chez la volaille (Opengart, 2008). Le tableau II résume les principales maladies causées par les cinq toxinotypes (Chen *et al.*, 2014; Freedman *et al.*, 2015; Li *et al.*, 2013; Nagahama, Ochi, *et al.*, 2015).

**Tableau I.** Classification des toxinotypes de *C. perfringens* selon les toxines majeures produites

Toxinotype	Toxines			
	$\alpha$	$\beta$	$\epsilon$	$\iota$
<b>A</b>	+	-	-	-
<b>B</b>	+	+	+	-
<b>C</b>	+	+	-	-
<b>D</b>	+	-	+	-
<b>E</b>	+	-	-	+



**Tableau II.** Principales maladies associées aux toxinotypes de *C. perfringens*

Toxinotype	Principales maladies
<b>A</b>	Gangrène gazeuse (Humain) Entérite nécrotique (Volaille) Entérocolite nécrotique (Porc) Gastroentérite hémorragique (Chien) Entérite hémorragique jéjunale (Bovin)
<b>B</b>	Dysenterie (Veau, agneau) Entérite (Veau, poulain) Entérotoxémie (Mouton)
<b>C</b>	Entérite nécrotique (Volaille) Mort subite (Chèvre, bovin de boucherie) Entérite (Porcelet, veau, poulain, agneau naissant) Entérotoxémie (Mouton)
<b>D</b>	Entérotoxémie (Veau, chèvre, agneau) Rein pulpeux (Mouton)
<b>E</b>	Entérite hémorragique (Veau) Entérotoxémie (Veau) Entérite (Lapin)

### 1.3 Les toxines

Parmi tout l'éventail de toxines produites par *C. perfringens*, la toxine  $\alpha$  est l'une des plus importantes. Le gène codant pour cette toxine, *cpa*, est présent dans tous les toxinotypes, ce qui rend cette toxine très prévalente (Li, *et al.*, 2013). Par contre, ce ne sont pas toutes les souches qui produisent la toxine  $\alpha$  même si le gène correspondant est présent (Morris & Fernandez-Miyakawa, 2009). Cette toxine a une activité enzymatique par l'entremise de la phospholipase C et de la sphingomyélinase (Cavalcanti, *et al.*, 2004; Li, *et al.*, 2013; Morris & Fernandez-Miyakawa, 2009; Nagahama *et al.*, 1996; Petit, *et al.*, 1999; Urbina *et al.*, 2009). Ainsi, elle hydrolyse les phospholipides des membranes cellulaires et la lécithine pour causer la mort des cellules affectées (Sakurai *et al.*, 2004). L'activité biologique de cette toxine est cytolytique, hémolytique,

dermonécrotique et létale (Cavalcanti, *et al.*, 2004; Petit, *et al.*, 1999; Sakurai, *et al.*, 2004). De plus, l'hydrolyse de la lécithine conduit à la relâche de médiateurs inflammatoires comme les leukotriènes, le thromboxane, le facteur d'activation des plaquettes et la prostacycline (Petit, *et al.*, 1999; Sakurai, *et al.*, 2004). Il en résulte une vasoconstriction, une augmentation de la perméabilité vasculaire, une agrégation plaquettaire et une dysfonction du myocarde. Ces effets peuvent conduire à un choc et même à la mort de l'animal. La toxine  $\alpha$  a longtemps été identifiée comme celle induisant les lésions d'entérite nécrotique chez la volaille. Par contre, une lignée de mutants dont le gène *cpa* a été inactivé et ne produisant pas la toxine  $\alpha$  s'est montrée capable d'induire les mêmes lésions par rapport à la souche originale produisant cette toxine (Keyburn *et al.*, 2006). Son implication dans la pathogénie de la maladie a ainsi été fortement remise en doute et d'autres facteurs comme la toxine NetB pourraient être à l'origine des lésions observées (Keyburn *et al.*, 2008). Finalement, la toxine alpha provoque la gangrène gazeuse chez de nombreuses espèces, dont l'humain (Li, *et al.*, 2013).

La toxine  $\beta$  est produite par les toxinotypes B et C de *C. perfringens*. Elle est une composante majeure des entérites nécro-hémorragiques produites par le toxinotype C chez les humains et les animaux (Autheman *et al.*, 2013; Gurtner *et al.*, 2010; Nagahama, *et al.*, 2015). Elle crée des pores sélectifs pour les cations monovalents dans les membranes cellulaires et cela cause un dérèglement de l'équilibre électrolytique normal (Freedman, *et al.*, 2015; Morris & Fernandez-Miyakawa, 2009; Nagahama, *et al.*, 2015). Il en résulte la mort rapide des cellules en induisant une nécrose de celles-ci (Autheman, *et al.*, 2013; Gurtner, *et al.*, 2010). Elle peut cibler les cellules endothéliales du système vasculaire car la toxine a été localisée dans l'endothélium des vaisseaux sanguins de

lésions d'entérite chez les porcelets et les humains (Autheman, *et al.*, 2013; Gurtner, *et al.*, 2010). De plus, un rapport de cas de «enteritis necroticans» chez un adulte japonais diabétique et un enfant diabétique montre grâce à la technique d'immunohistochimie que la toxine  $\beta$  était présente en grande quantité dans les lésions histologiques où des bâtonnets à Gram-positif étaient retrouvés dans un segment d'intestin nécrosé (Matsuda *et al.*, 2007). Un autre rapport de cas de cette maladie a identifié les gènes alpha et bêta, présents chez *C. perfringens* de type C, dans un segment d'intestin nécrotique réséqué d'un enfant diabétique (Petrillo *et al.*, 2000).

La toxine  $\beta_2$ , découverte en 1997 (Gibert *et al.*, 1997), peut être identifiée dans le tractus gastro-intestinal de toutes les espèces domestiques et sauvages. Le gène relié à la toxine, *cpb2*, est souvent présent lors de problèmes entériques. Chez les porcelets, sa présence est fortement en corrélation avec des épisodes de diarrhées (van Asten *et al.*, 2010). Dans ces cas, *C. perfringens* de type A ou C sont majoritairement porteurs du gène *cpb2*. Chez la volaille, *cpb2* est occasionnellement retrouvé dans les isolats de *C. perfringens* provenant des fèces, des coquilles, du duvet ou des carcasses. Il est cependant présent en même proportion chez des oiseaux en santé et chez des animaux atteints d'entérite nécrotique (Crespo *et al.*, 2007; van Asten, *et al.*, 2010). De ce fait, il a été proposé que la toxine  $\beta_2$  n'ait pas un rôle prépondérant dans la pathogénie de l'entérite nécrotique. Le mode d'action de cette toxine est mal défini à ce jour, mais elle aurait les mêmes effets cytotoxiques que la toxine  $\beta$ . La toxine  $\beta_2$  a d'ailleurs été découverte suite à l'identification d'une protéine de poids moléculaire différent de la toxine  $\beta$ , mais qui induisait les mêmes signes que cette dernière (Gibert, *et al.*, 1997). Par contre, elle possède moins de 15% d'homologie avec la toxine  $\beta$  (Li, *et al.*, 2013).

La toxine  $\epsilon$  (ETX) est produite par les toxinotypes B et D. Elle est une toxine très potente, c'est-à-dire qu'une très petite dose peut être létale (Li, *et al.*, 2013). En effet, une dose de 70 ng/kg est mortelle par injection intrapéritonéale chez la souris (Gill, 1982). Par comparaison, la toxine botulinique, aussi considérée très puissante, a une dose létale de 1.2 ng/kg par injection intrapéritonéale chez la souris. La toxine  $\epsilon$  est même sur la liste des agents et des maladies de bioterrorisme du gouvernement américain, classée dans la catégorie B (Stebbins, 2007). Elle est ainsi considérée modérément facile à disséminer, causant une morbidité modérée et une faible mortalité dans la population et elle demande un diagnostic et une surveillance accrue par les instances gouvernementales. La toxine est cytotoxique pour les cellules. Elle forme des pores dans la membrane vasculaire, créant ainsi un efflux de  $K^+$  et un influx de  $Na^+$  et de  $Cl^-$  (Bokori-Brown *et al.*, 2011; Li, *et al.*, 2013; Popoff, 2011). Il en résulte un gonflement de la cellule et sa mort. ETX est reconnue pour causer de l'œdème et la nécrose dans plusieurs organes à la suite d'une entérotoxémie (Popoff, 2011). C'est d'ailleurs ce qui se produit dans la maladie du rein pulpeux chez l'agneau. Ces effets conduisent au choc et ultimement à la mort de l'animal ou de l'humain affecté. La progression de l'entérotoxémie peut être très rapide, allant d'une mort en quelques minutes à quelques heures.

*C. perfringens* de type E est le seul toxinotype à produire la toxine  $\iota$ . Elle fait partie de la famille des toxines binaires (Freedman, *et al.*, 2015; Li, *et al.*, 2013), c'est-à-dire qu'elle comporte deux sous-unités nécessaires pour exercer sa toxicité. La sous-unité Ia est la composante enzymatique alors que la sous-unité Ib est la composante permettant l'attachement à la cellule cible (Gibert *et al.*, 2007; Morris & Fernandez-Miyakawa, 2009; Sakurai *et al.*, 2009). Ia est une  $NAD^+$ -glycohydrolase (NADase) et une ADP-

ribosyltransférase (ARTase) (Sakurai, *et al.*, 2009). Son effet est de ribolyser l'actine des cellules pour la dépolymériser. Cela provoque une désorganisation des filaments d'actine et par conséquent, il y a perte de la forme de la cellule par destruction du cytosquelette (Chen, *et al.*, 2014; Gibert, *et al.*, 2007; Morris & Fernandez-Miyakawa, 2009). Il s'attache aux cellules et forme un pore heptamérique (Morris & Fernandez-Miyakawa, 2009; Sakurai, *et al.*, 2009). Cela permet l'efflux de K<sup>+</sup> et l'influx de Na<sup>+</sup>, en plus de permettre l'entrée de la sous-unité Ia dans la cellule. Cliniquement, la toxine est létale, dermonécrotique, cytotoxique, entérotoxique et elle produit des dommages intestinaux visibles en histopathologie (Morris & Fernandez-Miyakawa, 2009). La toxine montre un fort potentiel pour délivrer des composés peptidiques à l'intérieur de cellules, rendant son utilisation très intéressante en pharmacologie (Barth & Stiles, 2008).

L'entérotoxine (CPE) peut être produite par tous les toxinotypes existant, sauf le toxinotype B où la production de cette toxine n'a pas été rapportée (Li, *et al.*, 2013). Contrairement à la plupart des autres toxines qui sont produites pendant la phase de croissance de *C. perfringens*, CPE est seulement produite pendant la phase de sporulation (Veshnyakova *et al.*, 2010). Elle s'accumule dans de larges corps d'inclusions dans la cellule et elle est relâchée en grande quantité par lyse à la fin de la sporulation (Freedman, *et al.*, 2015). C'est ce qui conduit aux toxi-infections alimentaires chez les humains. Elle est parmi les causes de toxi-infections alimentaires les plus communes dans les pays industrialisés (Chen, *et al.*, 2014; Freedman, *et al.*, 2015). Par contre, la prévalence de ce gène dans la population de *C. perfringens* est généralement faible, de l'ordre de moins de 5% (Lindstrom *et al.*, 2011; Miki *et al.*, 2008). De plus, CPE cause de la diarrhée chez la plupart des espèces animales, dont les oiseaux (Morris &

Fernandez-Miyakawa, 2009). L'entérotoxine exerce sa toxicité par la formation de pores de type  $\beta$  (Kitadokoro *et al.*, 2011), comme les autres toxines formatrices de pores précédemment décrites. La fixation de l'entérotoxine à la cellule est permise par les claudines (Chen, *et al.*, 2014; Freedman, *et al.*, 2015; Veshnyakova, *et al.*, 2010), qui sont des éléments importants des jonctions serrées. Cette toxine cause donc un dérèglement de l'équilibre électrolytique et conduit à la mort des cellules affectées par une élévation du  $\text{Ca}^{2+}$  intracytoplasmique et une diminution du  $\text{K}^+$  intracellulaire (Chen, *et al.*, 2014; Freedman, *et al.*, 2015) Au niveau intestinal, elle cause une perte de liquide et une nécrose de l'épithélium atteint. Elle a une activité létale, cytotoxique et entérotoxique (Morris & Fernandez-Miyakawa, 2009).

La toxine NetB (Necrotic Enteritis Toxin B-like) a été récemment découverte suite à la création d'un mutant ne produisant pas la toxine  $\alpha$  (Keyburn, *et al.*, 2006). La toxine est possiblement impliquée dans la pathogénie de l'entérite nécrotique chez le poulet à cause de sa forte association avec la maladie (Keyburn, *et al.*, 2008; Keyburn, Yan, *et al.*, 2010). La protéine a été purifiée et elle a pu induire des changements pathologiques reliés à l'entérite nécrotique *in vitro* et *in vivo* (Keyburn, *et al.*, 2008; Smyth & Martin, 2010). La toxine comporte 38% d'homologie avec la toxine  $\beta$  de *C. perfringens* (Keyburn, Bannam, *et al.*, 2010). Comme cette dernière, elle forme des pores menant à l'efflux de  $\text{K}^+$  et à l'influx de  $\text{Na}^+$ , de  $\text{Ca}^{2+}$  et de  $\text{Cl}^-$  conduisant à la lyse osmotique de la cellule (Keyburn, Bannam, *et al.*, 2010).

La toxine TpeL a été récemment découverte dans des souches de *C. perfringens* de type A, B et C (Amimoto *et al.*, 2007). Elle est une protéine faisant partie de famille des larges cytotoxines produites par des clostridies. Contrairement aux autres toxines

produites par *C. perfringens*, TpeL est produite en petite quantité pendant la phase végétative (Amimoto, *et al.*, 2007). La toxine est plutôt produite en phase de sporulation car le gène *tpeL* est exprimé en plus grande quantité pendant cette phase (Paredes-Sabja *et al.*, 2011). Elle s'est révélée cytotoxique pour les souris et les cellules, mais à un degré moindre que les toxines  $\beta$  et  $\beta 2$ . Selon des travaux récents, la toxine est une glucosyltransférase qui glycosyle les sous-familles de protéines RAS et RAC (Guttenberg *et al.*, 2012; Nagahama *et al.*, 2011; Pauillac *et al.*, 2013). Elle a des effets cytotoxiques menant à l'apoptose des cellules cibles (Guttenberg, *et al.*, 2012). Plus récemment, il a aussi été montré que la toxine TpeL est capable d'induire des fibres de stress *in vitro* dans des cellules rénales de chiens par l'activation de la voie de signalisation Rhoa/Rock (Nagahama, Ohkubo, *et al.*, 2015). Jusqu'à présent, une seule étude portant sur le rôle de la toxine TpeL dans l'entérite nécrotique a été réalisée en comparant la virulence de souches de *C. perfringens* possédant le gène *tpeL* avec des souches exemptes du gène, mais elle ne permet pas de conclure sur l'implication de la toxine dans la pathogénie de l'entérite nécrotique (Coursodon *et al.*, 2012).

#### 1.4 La régulation de la production de toxines

La production de toxines chez *C. perfringens* est régulée par différents mécanismes intracellulaires et intercellulaires et les toxines ne possèdent pas toutes les mêmes mécanismes de régulation (Ohtani & Shimizu, 2015). De plus, une même toxine peut comporter plus d'un mécanisme de régulation pour produire certaines toxines. En premier, le système à deux composantes VirR/VirS régule plusieurs gènes de virulence, dont la toxine alpha et la sialidase (Ohtani *et al.*, 2010; Ohtani & Shimizu, 2015). Il s'agit

d'un mécanisme possédant un récepteur cellulaire (VirS pour «sensor») et une composante cytoplasmique (VirR pour «regulator») (Chen, *et al.*, 2014) pour augmenter la transcription du gène suite à un stimulus extérieur. Une étude a identifié ce gène en amont du gène *netB* et la création de mutants pour le gène *virR* a montré une diminution de la production de toxine NetB chez ces mutants (Cheung *et al.*, 2010). La complémentation du mutant avec *virR* a aussi permis de rétablir une production normale de la toxine par la bactérie, suggérant ainsi que la production de toxine NetB est régulée par le système VirR/VirS (Cheung, *et al.*, 2010). Selon une étude de Vidal *et al.*, la transcription des gènes *cpb* (toxine  $\beta$ ) et *pfo* (perfringolysine) est augmentée lorsque *C. perfringens* est mis en contact direct avec des cellules Caco-2 (Vidal *et al.*, 2009). Cette étude conclut que l'interaction entre la cellule hôte eucaryote et la bactérie *C. perfringens* est importante pour l'augmentation de la production de toxines. De plus, ils ont noté qu'il y avait une corrélation positive entre l'augmentation du nombre de cellules eucaryotes et les niveaux de toxine  $\beta$  (Vidal, *et al.*, 2009). Finalement, Vidal *et al.* ont aussi fixé les cellules Caco-2 avec du paraformaldéhyde pour préserver la surface cellulaire et ainsi vérifier si des cellules non viables avec une paroi cellulaire intacte pouvaient également augmenter la production de toxines. Ils ont noté une transcription des gènes de toxines identique lorsque les bactéries sont mises en contact avec les cellules viables et non viables (Vidal, *et al.*, 2009). Ils ont conclu que la régulation de la production de la toxine  $\beta$  nécessite l'interaction avec des cellules hôtes intactes, mais non nécessairement viables. Chez *C. perfringens* de type C, un modèle d'infection de ligatures intestinales en boucles chez le lapin avec l'injection d'un mutant *virR* a montré une perte de pathogénicité par rapport à la souche originale injectée (Ma *et al.*, 2011). Cette même étude a montré une



baisse de la létalité du mutant dans un modèle murin par rapport à la souche originale (Ma, *et al.*, 2011). Finalement, ce mutant s'est montré non cytotoxique pour les cellules Caco-2 dans un modèle *in vitro* sous anaérobiose alors que la souche originale est cytotoxique (Ma, *et al.*, 2011). L'importance du système VirR/VirS dans la régulation de la production des toxines a donc été montrée tant au niveau moléculaire qu'au niveau biologique grâce à la perte de pathogénicité suite à l'inactivation de ce système. Ce système serait donc important pour les interactions entre *C. perfringens* et les cellules eucaryotes, par exemple des cellules Caco-2, pour la production éventuelle de toxines.

Il existe aussi une autre méthode de régulation de la transcription de gènes concernant les interactions entre bactéries. Ce processus, aussi appelé «*quorum-sensing*» (Ohtani & Shimizu, 2015) régule la transcription de gènes en fonction de la densité bactérienne dans un environnement donné. La molécule «*autoinducer-2*» (AI-2), régulée par le gène *luxS*, sert de signal intercellulaire pour contrôler la production de certaines toxines chez *C. perfringens* (Ohtani *et al.*, 2002; Ohtani & Shimizu, 2015). Il a été montré par Ohtani *et al.* en 2002, qu'un mutant ne possédant pas le gène *luxS* avait une production diminuée des toxines alpha, kappa et thêta (Ohtani, *et al.*, 2002). La molécule AI-2 est aussi produite par d'autres espèces bactériennes et permettrait ainsi une communication inter-espèce entre *C. perfringens* et d'autres espèces bactériennes présentes dans son environnement pour réguler sa production de toxines (Ohtani, *et al.*, 2002).

Le système «*accessory gene regulator*» (*agr*) est un autre système de détection de la densité bactérienne pour réguler la transcription de gènes. Sa présence chez *C. perfringens* a montré l'importance de ce mécanisme de régulation pour l'entérite nécro-

hémorragique chez le lapin et les entérotoxémies fatales chez la souris causées par une souche de *C. perfringens* de type C (Vidal *et al.*, 2012). Il a été rapporté par Ohtani *et al.* (2009) que le système *agr*, avec le système VirR/VirS fonctionnel, était requis pour la production des toxines alpha, kappa et thêta en milieu de culture *in vitro* (Ohtani, *et al.*, 2009). La création de mutants dépourvus du gène *agr* a aussi montré que ce système était requis pour la production des toxines alpha, ETX et perfringolysine en milieu de culture *in vitro* ainsi que pour la production de la toxine ETX en présence de cellules Caco-2 dans un modèle de culture cellulaire (Chen *et al.*, 2011). Le système *agr* ne servirait pas qu'à réguler la production de toxines car il s'est aussi montré important pour la production de biofilm. En effet, selon une étude de Vidal *et al.* (2015), la création d'un mutant sans le gène *agr* chez une souche de *C. perfringens* rendait cette dernière incapable de former un biofilm, alors que la souche originale présentait une bonne production de biofilm (Vidal, *et al.*, 2015). En conclusion, les systèmes VirR/VirS, *luxS/AI-2* et *agr* ne sont pas les seuls mécanismes de régulation de production de toxines, mais ils sont les plus largement étudiés jusqu'à présent (Ohtani & Shimizu, 2015). Ces mécanismes sont des moyens de communications extracellulaires qui interagissent avec un mode de régulation intracellulaire pour contrôler la synthèse de toxines en fonction de l'environnement de la bactérie.

## 1.5 La production de bactériocines

Une bactériocine est un peptide antibactérien produit par une bactérie qui agit contre des bactéries de la même espèce ou d'un autre genre (Cotter *et al.*, 2005). La bactérie produisant une bactériocine n'est pas affectée par cette dernière, mais cela lui

permet d'inhiber la croissance des bactéries avoisinantes et d'ainsi prédominer dans le milieu. Les bactériocines ont un spectre d'action étroit ou large et chaque bactériocine n'exerce son effet que sur certain types de bactéries (Cotter, *et al.*, 2005). Par exemple, la *nisin* a un spectre d'action large en étant efficace envers plusieurs bactéries à Gram-positif telles les staphylocoques, les streptocoques, les bacilles, les clostridies ainsi qu'une bonne efficacité contre les mycobactéries. Au contraire, la lactococcin A est efficace seulement envers certaines souches de *Lactococcus lactis* (Jack *et al.*, 1995).

La colicine, la première bactériocine découverte en 1925, a été identifiée chez *Escherichia coli* (Gratia, 1925). Les bactériocines ont depuis été caractérisées chez plusieurs bactéries et archaea. Il existe d'ailleurs une base de données nommée BACTIBASE<sup>©</sup> regroupant les bactériocines. Jusqu'à maintenant, elle comprend plus de 200 bactériocines répertoriées, dont la plupart sont produites par des bactéries à Gram-positif (Bactibase, 2013). De celles-ci, plusieurs bactériocines sont produites par des bactéries produisant de l'acide lactique (Cotter, *et al.*, 2005). Cela rend leur emploi très utile pour améliorer la conservation et pour réduire la quantité de bactéries pathogènes dans les produits alimentaires tels les produits carnés (Cotter, *et al.*, 2005; Nishie *et al.*, 2012).

Dans les cas d'entérite nécrotique chez le poulet, il est commun de n'observer qu'une souche de *C. perfringens* dans les fèces. Dans de rares cas, il est possible d'en retrouver deux. Cela a été montré avec des PFGE réalisés à partir de d'isolats provenant d'oiseaux montrant des signes d'entérite nécrotique (Gholamiandekhordi *et al.*, 2006; Nauerby *et al.*, 2003). Il a même été montré que les oiseaux sains d'un troupeau affecté d'entérite nécrotique clinique avaient des souches de *C. perfringens* de même clonalité

que les oiseaux malades de ce même troupeau (Chalmers, Bruce, *et al.*, 2008). Il en a été de même pour des souches issues de cas de cholangiohépatites où seulement une à deux souches ont pu être mises en évidence au PFGE (Nauerby, *et al.*, 2003). Par contraste, il est plus fréquent de retrouver plusieurs souches de *C. perfringens* dans des oiseaux issus de troupeaux sains (Gholamiandekhordi, *et al.*, 2006; Nauerby, *et al.*, 2003). Cela suggère que certaines souches virulentes pourraient inhiber la croissance d'autres souches de *C. perfringens* dans des cas d'entérite nécrotique. Cela a été démontré lors de l'inoculation orale d'un mélange de plusieurs souches différentes de *C. perfringens* aux mêmes oiseaux (Barbara *et al.*, 2008). Dans cette étude, une souche de *C. perfringens* provenant d'un cas d'entérite nécrotique a été administrée oralement à des poulets dans un inoculum comprenant aussi quatre autres souches de *C. perfringens* provenant de troupeaux sains. Un autre essai avec l'inoculation de 5 souches provenant toutes de cas d'entérite nécrotique a aussi été fait par la suite. Dans les deux cas, Barbara *et al.* (2008) ont identifié la même souche pendant la période d'inoculation de 4 jours. De plus, les souches de *C. perfringens* d'entérite nécrotique ont montré la capacité d'inhiber la croissance *in vitro* de souches *C. perfringens* provenant de troupeaux sains, mais l'inverse n'a pas été observé (Barbara, *et al.*, 2008; Timbermont, Lanckriet, Pasmans, *et al.*, 2009). Il a été suggéré que ces souches de *C. perfringens* provenant de cas d'entérite nécrotique seraient capables de sécréter des substances dans leur environnement pour empêcher la croissance d'autres souches de *C. perfringens*. D'ailleurs, une bactériocine nommée *Perfrin* a récemment été isolée de souches provenant d'entérite nécrotique (Timbermont *et al.*, 2014). Elle a montré une bonne capacité à inhiber la croissance de *C. perfringens*, mais cette capacité d'inhibition de la croissance s'est montrée plus faible que

la souche de *C. perfringens* à partir de laquelle elle a été purifiée. D'après Timbermont, d'autres bactériocines pourraient être produites par *C. perfringens*. Cela pourrait expliquer la différence d'inhibition de la croissance entre la bactériocine purifiée et la bactérie ayant servi à la purifier. De plus, le gène codant pour cette bactériocine n'a été détecté que parmi 10 des 50 souches testées. Ces souches étaient toutes positives pour le gène *netB* et 9 d'entre elles avaient été isolées à partir de cas cliniques d'entérite nécrotique, l'autre provenant d'un oiseau sain. Finalement, le gène codant pour la *Perfrin* n'a été retrouvé que chez des isolats de *C. perfringens* provenant d'oiseaux, les isolats provenant d'autres espèces animales étant négatifs au PCR pour ce gène. Selon Timbermont *et al.* (2014), cette bactériocine pourrait contribuer dans la pathogenèse de l'entérite nécrotique causée par des souches virulentes de *C. perfringens*, mais il y a probablement d'autres facteurs qui influencent la prédominance de certaines souches virulentes dans un environnement.

## **2. L'entérite nécrotique**

### **2.1 Étiologie**

L'agent causal de l'entérite nécrotique est une bactérie à Gram-positif, *C. perfringens* de type A ou C (Fulton, 2013; Opengart, 2008). Ces toxinotypes peuvent également être isolés d'oiseaux sains (Cooper & Songer, 2009), suggérant d'autres facteurs causals que la seule action de la toxine alpha. Récemment, la découverte de la toxine NetB par une équipe de chercheurs australiens a permis d'identifier un facteur très important dans la production de dommages intestinaux par les souches virulentes de *C. perfringens* (Keyburn, *et al.*, 2008). De plus, des souches de *C. perfringens* de type A

isolées d'autres espèces que la volaille sont normalement incapables d'induire des lésions d'entérite nécrotique, alors que les souches provenant de cas d'entérite nécrotique sont capables de reproduire de manière constante la maladie dans des modèles d'infection expérimentale (Cooper *et al.*, 2010; Timbermont, Lanckriet, Gholamiandehkordi, *et al.*, 2009). Par contre, une autre étude ayant utilisé une souche de *C. perfringens* provenant d'une vache et positive pour le gène *netB* s'est également montrée capable de reproduire des lésions d'entérite nécrotique chez des poulets lors d'infections expérimentales. Donc, les souches virulentes de *C. perfringens* seraient en majorité spécifiques d'espèce, sauf pour cette souche isolée d'un bovin qui est la seule souche rapportée provenant d'un mammifère et s'étant montrée pathogène pour les poulets.

Se questionnant sur l'implication de la toxine alpha dans l'entérite nécrotique, un groupe de chercheurs australiens a créé un mutant de *C. perfringens* dépourvu du gène *cpa* codant pour la toxine alpha, mutant qui a réussi à induire des lésions d'entérite nécrotique chez des poulets (Keyburn, *et al.*, 2006). Lors de travaux ultérieurs à la création de ce mutant, une nouvelle toxine causant des signes d'entérite nécrotique, NetB, a été découverte (Keyburn, *et al.*, 2008). Il a été proposé que cette toxine formatrice de pores soit un facteur de virulence majeur pour induire l'entérite nécrotique. En effet, un nouveau mutant sans le gène *netB* s'est montré incapable de reproduire des lésions d'entérite nécrotique chez les poulets. Par contre, la complémentation de ce mutant avec le gène *netB* a permis de rétablir sa pathogénicité. Selon les postulats moléculaires de Koch, ceci prouve que le gène *netB* est important dans la pathogénie de l'entérite nécrotique (Falkow, 2004). Par ailleurs, les souches de *C. perfringens* possédant le gène *netB* ont pu reproduire expérimentalement la condition dans un autre modèle d'infection

tandis que les souches ne le possédant pas n'induisaient pas de lésions d'entérite nécrotique (Smyth & Martin, 2010). Dans cette optique, une étude utilisant la technique de PCR a montré que le gène *netB* était présent dans presque tous les cas cliniques d'entérite nécrotique tandis que peu de souches de *C. perfringens* isolées de troupeaux sains portaient ce gène (Chalmers, Bruce, et al., 2008). Une autre étude ayant fait le toxinotypage par PCR de chaque souche montra que 90% des souches retrouvées dans des cas d'entérite nécrotique sous-clinique portaient le gène *netB* (Engstrom *et al.*, 2012). Par contre, des études de la prévalence de *netB* dans des troupeaux avec entérite nécrotique montrent que ce gène n'est pas toujours présent dans les souches isolées de ces élevages (Abildgaard *et al.*, 2010; Martin & Smyth, 2009). Dans ces deux études, respectivement 52% et 58% des souches provenant de troupeaux avec entérite nécrotique possèdent le gène *netB*. On pourrait donc soupçonner une forte association entre l'entérite nécrotique et la présence de ce gène dans plusieurs cas d'entérite nécrotique. Par contre, les troupeaux atteints d'entérite nécrotique avec des souches de *C. perfringens* ne possédant pas le gène *netB* montrent que cette toxine n'explique pas tous les cas d'entérite nécrotique. Il pourrait donc y avoir d'autres facteurs impliqués dans la pathogénie de la condition (Timbermont *et al.*, 2011; Van Immerseel *et al.*, 2009).

## 2.2 Impacts économiques sur l'élevage de poulets sans antibiotique

La bactérie *C. perfringens* est ubiquitaire de l'environnement des poulets et elle peut ainsi être ingérée par les oiseaux (Van Immerseel, *et al.*, 2009). Par conséquent, elle peut être isolée à partir de tous les types d'oiseaux, même sans problème d'entérite nécrotique (Cooper *et al.*, 2013). La surcroissance cette bactérie causant l'entérite

nécrotique est par contre bien contrôlée depuis plusieurs années avec l'ajout d'antibiotiques à la moulée, et ce durant tout l'élevage, notamment l'avoparcine, la bacitracine, la lincomycine et la virginiamycine (George *et al.*, 1982; Maxey & Page, 1977; Prescott, 1979; Prescott *et al.*, 1978; Wicker *et al.*, 1977). Par contre, cette prévention a un coût non négligeable. Par exemple, la prévention de l'entérite nécrotique aux États-Unis a été évaluée à 0,05\$ par poulet de chair produit (Van der Sluis, 2000). Dans une autre étude, une perte de 12% en poids et une augmentation de 10.9% de la conversion alimentaire ont été estimés à cause de problèmes d'entérite nécrotique sous-clinique chez les troupeaux affectés par la condition par rapport aux troupeaux sains (Skinner *et al.*, 2010).

Il y a cependant une réémergence de la condition suite au retrait de l'utilisation d'antibiotiques promoteurs de croissance en Europe et suite à la tendance à faire l'élevage de poulets sans antibiotique (Van Immerseel *et al.*, 2004). En Norvège, où l'utilisation d'avoparcine dans la moulée a été bannie, des pertes de production de 25 à 43% ont été enregistrées dans les élevages ayant un haut taux d'hépatites associées à une infection par *C. perfringens*. Une mauvaise conversion alimentaire et une baisse du poids d'abattage sont les causes principales de ces pertes (Lovland & Kaldhusdal, 2001). De plus, il y a une augmentation de des condamnations à l'abattoir suite à ces hépatites (Lovland & Kaldhusdal, 1999), contribuant à 20% des pertes de profits.

### 2.3 Voies de transmissions

La bactérie *C. perfringens* peut être retrouvée à de multiples endroits et sa capacité à sporuler lui permet de persister dans son environnement. Elle est un habitant



ubiquitaire dans les systèmes de productions avicoles. En effet, elle peut être isolée dans le couvoir, les poulaillers et l'abattoir d'une même chaîne de production (Craven *et al.*, 2003; Craven, Stern, *et al.*, 2001). Plus encore, les mêmes ribotypes peuvent être isolés, signe qu'il y a une transmission des souches entre les différents milieux de production (Craven, *et al.*, 2003). De plus, la bactérie peut persister dans un poulailler même suite au lavage et à la désinfection de celui-ci. Ainsi, des mêmes profils au PFGE ont été obtenus suite à l'isolement de *C. perfringens* de deux lots de poulets d'un même poulailler où un lavage et une désinfection a été fait entre ceux-ci (Engstrom, *et al.*, 2012). Au couvoir, la bactérie est retrouvée dans le duvet des oiseaux, sur la coquille des œufs éclos et sur les papiers envoyés aux fermes pour y déposer de la moulée au sol (Craven, Cox, *et al.*, 2001). La bactérie est aussi présente dans l'environnement du poulailler. Ainsi, elle peut être isolée à partir d'un écouvillonnage sur les murs, les ventilateurs, les collants anti-mouches, la terre à l'extérieur du poulailler et sur les bottes des travailleurs (Craven, *et al.*, 2001). De plus, les oiseaux excrètent la bactérie dans leurs fèces suite à l'ingestion de celle-ci (Craven, 2000). La moulée et la litière peuvent aussi être des sources d'infection dans les poulaillers (Opengart, 2008). Par exemple, la spore de *C. perfringens* est capable de résister au processus de cubage de la moulée à 90°C de la meunerie (Greenham *et al.*, 1987) et ainsi être transportée jusqu'au poulailler. Finalement, l'ingestion de mouches contenant la bactérie a aussi été l'hypothèse proposée lors d'un cas d'entérite nécrotique dans un élevage de poules pondeuses commerciales (Dhillon *et al.*, 2004). Lors du transport à l'abattoir, il a été montré que la bactérie pouvait être isolée à partir des cages de transport, même avant le chargement des oiseaux (Craven, *et al.*, 2001). À l'abattoir, *C. perfringens* est retrouvée à de multiples endroits, comme l'eau d'ébouillantage et de

refroidissement (Craven, 2001; Craven, *et al.*, 2001). De plus, les carcasses à l'abattoir sont souvent porteuses de la bactérie (Craven, *et al.*, 2001). Finalement, selon une étude ontarienne sur la présence de *C. perfringens* dans la viande de poulet en vente au détail, la bactérie a pu être isolée dans 66% des carcasses échantillonnées (Nowell, *et al.*, 2010). Ainsi, *C. perfringens* est retrouvée dans toute la chaîne de production avicole, notamment grâce à sa bonne capacité à persister dans l'environnement et parce qu'elle est pour la plupart du temps ubiquitaire de l'intestin des oiseaux. L'arrivée d'une souche virulente dans l'environnement des oiseaux les rend à risque de développer des problèmes d'entérite nécrotique, si les conditions sont propices au développement de la maladie.

#### 2.4 Facteurs de risques

Certaines conditions permettant l'établissement et la multiplication de souches virulentes de *C. perfringens* dans l'environnement intestinal des oiseaux sont nécessaires pour causer l'entérite nécrotique chez les poulets (Uzal *et al.*, 2015). Plusieurs facteurs de risque ont été incriminés dans les différentes publications portant sur l'entérite nécrotique.

Le facteur de risque considéré le plus important est la création de dommages intestinaux suite à une infection par des coccidies. La coccidiose est reconnue depuis plusieurs années comme un facteur prédisposant important (Al-Sheikhly & Al-Saieg, 1980; Rodgers *et al.*, 2015; Timbermont, *et al.*, 2011; Williams *et al.*, 2003) car celle-ci précède souvent les cas d'entérite nécrotique (Timbermont, *et al.*, 2011; Van Immerseel, *et al.*, 2004). D'ailleurs, cette synergie est souvent utilisée pour reproduire l'entérite nécrotique expérimentalement (Uzal, *et al.*, 2015). En effet, l'utilisation d'une surdose

d'un vaccin contenant différentes espèces d'*Eimeria spp.* est une méthode répandue pour créer des dommages intestinaux et ainsi favoriser la colonisation de l'intestin par *C. perfringens* lors d'inoculation subséquente (Cooper & Songer, 2010; Shojadoost *et al.*, 2012; Timbermont, *et al.*, 2011; Uzal, *et al.*, 2015; Van Immerseel, *et al.*, 2004).

Un environnement intestinal favorisant la croissance de *C. perfringens* est une autre composante majeure au développement de l'entérite nécrotique (Timbermont, *et al.*, 2011; Uzal, *et al.*, 2015). Plusieurs grains contenant de fortes teneurs en fibres non digestibles et solubles dans l'eau, tels l'avoine, l'orge, le seigle et le blé, présentent un risque au développement de l'entérite nécrotique lorsqu'ils sont inclus dans l'alimentation (Branton *et al.*, 1987; Lee *et al.*, 2011; Timbermont, *et al.*, 2011). Ils permettraient une diminution de la vitesse du transit intestinal, une augmentation de la viscosité ou une modification du microbiote intestinal, favorisant ainsi la multiplication bactérienne (Uzal, *et al.*, 2015). Certains grains, tels l'orge et le blé, permettent une plus grande prolifération *in vivo* (Jia *et al.*, 2009) et *in vitro* (Annett *et al.*, 2002) de *C. perfringens* par rapport à d'autres grains, tel le maïs. De plus, des lésions d'entérite nécrotique plus sévères sont observées lorsque des moulées contenant ces intrants alimentaires sont utilisées par rapport aux moulées à base de maïs (Branton *et al.*, 1997; Jia, *et al.*, 2009; Timbermont, *et al.*, 2011; Van Immerseel, *et al.*, 2004).

Certaines diètes à haute teneur en protéines peuvent aussi prédisposer à l'entérite nécrotique. Par exemple, les moulées contenant de la farine de poisson ou de pomme de terre comme source de protéine permettent une meilleure croissance de *C. perfringens* par rapport aux moulées avec d'autres sources de protéines d'origine végétale, comme le soja (Drew *et al.*, 2004). Il y a aussi une plus grande incidence de lésions d'entérite

nécrotique dans les intestins et celles-ci sont plus sévères avec les diètes riches en pomme de terre (Palliyeguru *et al.*, 2010) par rapport à des moulées standard. De plus, la prise de poids et la prise alimentaire sont inférieures avec les diètes riches en farine de poisson et de pomme de terre (Palliyeguru, *et al.*, 2010).

Ensuite, les maladies immunosuppressives affectant les oiseaux peuvent entraîner des problèmes d'entérite nécrotique. Ainsi, la maladie de Gumboro, la maladie de Marek ou l'anémie infectieuse du poulet peuvent prédisposer à l'entérite nécrotique (Lee, *et al.*, 2011; Timbermont, *et al.*, 2011). De plus, les stress environnementaux, tels les changements de d'alimentation, les écarts de température, les hautes ou basses températures prolongées ainsi que les hautes densités d'oiseaux en élevage, sont toutes des conditions créant une immunosuppression prédisposant à l'entérite nécrotique (Lee, *et al.*, 2011; Timbermont, *et al.*, 2011). Il a aussi été rapporté que la mycotoxine deoxynivalenol (DON), immunosuppressive chez les poulets, à des concentrations de 3.000 à 4.000 µg/kg de moulée augmentait la proportion d'oiseaux atteints d'entérite nécrotique sous-clinique dans une infection expérimentale (Antonissen *et al.*, 2014). Finalement, la présence de souches virulentes produisant certaines toxines est essentielle au développement de problèmes d'entérite nécrotique (Cooper, *et al.*, 2010; Uzal, *et al.*, 2015). Par exemple, il est rapporté que les souches de *C. perfringens* isolées de cas d'entérite nécrotique et produisant la toxine NetB reproduisent la maladie dans les modèles d'infections expérimentaux plus efficacement que les souches négatives pour *netB* (Uzal, *et al.*, 2015). Ce point sera couvert plus en détail dans la section 4 : Modèles d'entérite nécrotique.

## 2.5 Pathogénie

La pathogénie de la maladie a été résumée par Timbermont (Timbermont, *et al.*, 2011). La première étape de l'infection est la mort d'entérocytes. Cette mort entraîne la fuite de protéines plasmatiques dans la lumière intestinale (Timbermont, *et al.*, 2011) qui permet à la bactérie *C. perfringens* d'avoir un substrat adéquat pour sa croissance. Une des principales causes associées à la mort d'entérocytes est la coccidiose, une infection parasitaire par *Eimeria* spp. En plus de ces dommages aux cellules épithéliales, la coccidiose intestinale provoque une surproduction de mucus par les cellules à gobelets. Ceci fournit une source de nutriments supplémentaire à *C. perfringens*. Ces deux effets permettent à la bactérie d'obtenir un milieu favorable à sa multiplication (Timbermont, *et al.*, 2011). Pendant cette phase de multiplication de *C. perfringens*, il a été démontré que certaines souches virulentes de *C. perfringens* inhibent la croissance des autres souches grâce à la production de bactériocines (Timbermont, *et al.*, 2014; Timbermont, Lanckriet, Pasmans, *et al.*, 2009). Ainsi, peu de variation parmi les souches isolées des cas d'entérite nécrotique d'un même élevage a été observée au PFGE ou au MLST (Chalmers, Bruce, *et al.*, 2008; Gholamiandekhordi, *et al.*, 2006; Nauerby, *et al.*, 2003). Ceci démontre la prédominance dans la population de *C. perfringens* de l'environnement intestinal des oiseaux, d'une souche particulièrement virulente lors d'épisode d'entérite nécrotique (Barbara, *et al.*, 2008). Ensuite, les souches virulentes pourraient s'attacher à l'épithélium intestinal en s'adhérant à des molécules de la matrice extracellulaire des cellules comme le collagène de type III ou IV ainsi qu'au fibrinogène (Timbermont, *et al.*, 2011). Finalement, la sécrétion de toxines létales pour les entérocytes produit des dommages intestinaux qui commencent en portion basolatérale des entérocytes pour ensuite se

disséminer à toute la lamina propria (Timbermont, *et al.*, 2011). Il en résulte une nécrose intestinale massive.

## 2.6 Signes cliniques

Dans les élevages, l'entérite nécrotique apparaît généralement chez les poulets à griller vers l'âge de 2 à 5 semaines, quoique la condition a été vue chez des poulets de 2 semaines à 6 mois (Opengart, 2008). Des cas ont aussi été rapportés chez des poules pondeuses de 3 à 6 mois élevées au sol, des poules pondeuses de remplacement élevées en cage de 12 à 16 semaines et chez des poules pondeuses en cage en phase de production (Opengart, 2008). Finalement, des rapports de cas relatent des problèmes d'entérite nécrotique chez des dindonneaux, des dindes de 7 à 12 semaines ainsi que chez des dindes avec une infection concomitante aux ascaridés ou aux coccidies (Opengart, 2008).

Dans la forme aiguë de la maladie, les oiseaux apparaissent déshydratés, apathiques avec les plumes ébouriffées et une réticence à bouger. Une baisse de l'appétit et de la diarrhée liquide et brunâtre sont souvent observées (Cooper, *et al.*, 2013; Opengart, 2008; Van Immerseel, *et al.*, 2004). Dans les cas suraigus, aucun signe clinique n'est observé et les oiseaux sont tout simplement retrouvés morts au sol. La mort des oiseaux peut survenir en 1 ou 2 heures et la mortalité totale du troupeau peut atteindre 50% (Timbermont, *et al.*, 2011). Dans la forme sous-clinique, aucun signe clinique d'entérite et aucune hausse de mortalité ne sont notés (Timbermont, *et al.*, 2011; Van Immerseel, *et al.*, 2004). Par contre, il y a une baisse des performances dans le troupeau et une possible augmentation des condamnations à l'abattoir, surtout à cause d'une

augmentation des cas d'hépatites associées à *C. perfringens* (Lovland & Kaldhusdal, 2001).

## 2.7 Lésions macroscopiques

Dans la forme clinique, les intestins sont minces et friables et souvent distendus par du gaz. Les portions majoritairement atteintes sont le duodénum, jéjunum et l'iléum, quoique les caeca puissent aussi être atteints (Opengart, 2008; Timbermont, *et al.*, 2011; Van Immerseel, *et al.*, 2004). A l'ouverture de intestin, on note une odeur nauséabonde et la muqueuse peut être recouverte d'une pseudomembrane jaune-verdâtre nommée membrane diphtérique. Ces lésions sont observées au décès de l'oiseau, mais des lésions focales à multifocales de zones nécrotiques de taille variable, localisées à coalescentes, ont été décrites lors d'infection expérimentale (Keyburn, Portela, Ford, *et al.*, 2013; Keyburn, Portela, Sproat, *et al.*, 2013). Dans la forme sous-clinique, des ulcères sur la muqueuse intestinale peuvent être observés, mais essentiellement on observera une baisse des performances en élevage (Lovland & Kaldhusdal, 2001). Cette forme peut aussi être associée à des cas d'hépatites et de cholangiohépatites associées à *C. perfringens* à l'abattage (Lovland & Kaldhusdal, 2001). Dans ces cas, il y a une hépatomégalie et il y a des foyers pâles multifocaux disséminés dans le foie (Van Immerseel, *et al.*, 2004).

## 2.8 Lésions microscopiques

Un épisode clinique d'entérite nécrotique est caractérisé par une nécrose de coagulation sévère de la muqueuse intestinale avec une grande quantité de fibrine et de débris cellulaires adhérents à la muqueuse nécrosée (Cooper, *et al.*, 2013; Opengart, 2008).

Dans les premiers stades de la condition, l'apex des villosités est nécrosé. Plus la condition évoluera, plus il y aura une progression de la nécrose de l'apex vers les cryptes intestinales (Opengart, 2008). Les lésions peuvent être localisées à la muqueuse et à la lamina propria dans les cas peu sévères, mais elles peuvent s'étendre à la sous-muqueuse et à la *muscularis mucosa* dans les cas plus sévères (Cooper, *et al.*, 2013). De plus, il y a une forte colonisation par des bâtonnets à Gram-positif sur les villosités et dans les débris nécrotiques (Cooper, *et al.*, 2013; Fulton, 2013; Opengart, 2008). Des cellules inflammatoires, principalement des hétérophiles, entourent les zones nécrotiques dans les lésions aiguës (Cooper, *et al.*, 2013).

Lorsqu'il y a des lésions hépatiques, il y a une hyperplasie des canaux biliaires avec une fibrose et infiltration cellulaire de ceux-ci. Des foyers multifocaux d'inflammation granulomateuse dans le foie (Cooper, *et al.*, 2013; Lovland & Kaldhusdal, 1999; Opengart, 2008) sont aussi présents. Des zones multifocales de nécrose de coagulation seront observées avec présence d'exsudat fibrineux et de bâtonnets à Gram-positif (Cooper, *et al.*, 2013).

## 2.9 Chronologie du développement des lésions microscopiques

Lors d'une inoculation expérimentale en 1977 d'un bouillon de *C. perfringens* intra-duodéal à des poulets, la chronologie de l'apparition des lésions a été décrite (Al-Sheikhly & Truscott, 1977). Une heure après l'inoculation, il y avait un léger œdème intestinal avec dilatation des vaisseaux sanguins. À ce moment, la muqueuse commençait à s'éroder et un grand nombre de clostridies pouvaient déjà y être observées. Trois heures post-inoculation, les intestins avaient une apparence grisâtre avec une muqueuse épaissie.



L'épithélium de la lamina propria se détachait, surtout au niveau de l'apex des villosités, un résultat probable de l'œdème marqué observé. L'érosion de l'épithélium avait progressé et était plus marquée avec la présence d'un exsudat fibrineux et une dégénérescence des villosités. À 5 heures post-inoculation, il y avait une nécrose de coagulation de l'épithélium et de la lamina propria des villosités. Ces dernières étaient plus courtes et la lamina propria était infiltrée par de nombreux hétérophiles et cellules mononucléaires. Les vaisseaux sanguins étaient congestionnés ou bouchés par des thrombi hyalins. De plus, le tissu nécrotique des villosités endommagées et l'apex de la lamina propria ainsi exposée était colonisé par des bactéries à Gram-positif. À 8 et 12 heures post-inoculation, il y avait une nécrose massive des villosités et des cryptes avec présence de débris cellulaires et de fibrine dans la lumière intestinale. À 12 heures post-inoculation, d'autres effets au niveau systémique pouvaient être observés. Ainsi, les vaisseaux sanguins dans le foie, les reins, la rate et le cœur pouvaient être congestionnés.

## 2.10 Diagnostic

Le diagnostic final d'entérite nécrotique n'est pas basé sur un seul test, mais plutôt sur plusieurs critères, soit l'apparence des lésions macroscopiques, des lésions microscopiques et de l'isolement de l'agent causal (Opengart, 2008). Les lésions macroscopiques sont fortement suggestives d'entérite nécrotique. En effet, les lésions nécrotiques focales, multifocales ou diffuses sont souvent retrouvées dans ce cas (Cooper, *et al.*, 2013). Par contre, il ne s'agit pas de lésions pathognomoniques à la condition car l'entérite ulcéraire causée par *Clostridium colinum* peut engendrer les mêmes lésions (Cooper, *et al.*, 2013). L'histologie permet d'exclure d'autres causes

d'entérites comme la coccidiose, mais la visualisation de bâtonnets à Gram-positif ne permettra pas d'établir un diagnostic final (Cooper, *et al.*, 2013). L'isolement de *C. perfringens* de type A est une méthode diagnostique permettant d'identifier la bactérie pathogène chez les oiseaux affectés, mais ce toxinotype est aussi présent chez les oiseaux sains (Cooper, *et al.*, 2013). Dans le même ordre d'idée, la détection du gène *cpa* dans le contenu intestinal est aussi intéressante, mais il peut être présent chez les animaux sains (Cooper, *et al.*, 2013). Dans des recherches plus récentes, la détection du gène *netB* est importante car la toxine NetB reliée à ce gène peut induire l'entérite nécrotique sans que le gène *cpa* soit présent (Keyburn, *et al.*, 2008; Keyburn, *et al.*, 2006). Par contre, certaines souches de *C. perfringens* ne possédant pas le gène *netB* ont aussi la capacité d'induire des lésions d'entérite nécrotique (Cooper & Songer, 2010). Donc, la détection du gène *netB* dans les *C. perfringens* isolés de cas d'entérite nécrotique n'est pas une approche complètement fiable.

## 2.11 Traitement

Plusieurs classes d'antibiotiques sont efficaces contre les bactéries à Gram-positif comme *C. perfringens*, dont les pénicillines, les céphalosporines, la vancomycine, les tétracyclines, les macrolides, le chloramphénicol, les sulfamides et le triméthoprime (Harley *et al.*, 2010). Un épisode classique d'entérite nécrotique clinique est traité efficacement par plusieurs antibiotiques. Parmi les antibiotiques utilisés dans l'eau de boisson, il y a la lincomycine, la bacitracine, l'oxytétracycline, la pénicilline et la tylosine (Opengart, 2008). Par contre, peu d'antibiotiques parmi ceux énumérés ci-dessus sont homologués pour le traitement de cette maladie au Canada. Les antibiotiques homologués

au Canada avec les posologies utilisées pour le traitement de l'entérite nécrotique sont indiquées dans le tableau III ("Compendium of Veterinary Products," 2015).

**Tableau III.** Antibiotiques homologués en 2015 au Canada pour le traitement de l'entérite nécrotique

Antibiotique	Mode d'administration	Concentration	Temps de traitement (jours)	Temps de retrait (jour)
Lincomycine	Eau de boisson	16 mg/L	7	0
Tylosine	Eau de boisson	100-150 mg/L	5	1
Tylosine	Moulée	200 mg/tonne	7	0
Pénicilline potassique	Eau de boisson	300 000 U.I./L	5	1

## 2.12 Prévention

La prévention de l'entérite nécrotique consiste en premier lieu à contrôler les facteurs de risques (Opengart, 2008). Le choix des intrants composant la moulée aide à prévenir l'entérite nécrotique. Ainsi, l'inclusion de maïs et de soja dans la moulée au lieu d'avoine, d'orge, de seigle, de blé, de farine de poisson est un moyen de prévention contre l'entérite nécrotique. Les diètes riches en protéines sont aussi à éviter. À cause de la fluctuation des prix des aliments, il est cependant possible de retrouver des aliments prédisposant à l'entérite nécrotique.

La prévention de l'entérite nécrotique par l'utilisation d'antibiotiques est une méthode utilisée depuis plusieurs années. En effet, plusieurs rapports montrent l'efficacité d'antibiotiques tels l'avoparcine, la bacitracine et la virginiamycine à prévenir l'entérite nécrotique (George, *et al.*, 1982; Prescott, 1979; Prescott, *et al.*, 1978; Wicker, *et al.*, 1977). Il a aussi été montré que le narasin, un anticoccidien de type ionophore, est capable de prévenir l'entérite nécrotique (Brennan *et al.*, 2001). Les antibiotiques

homologués au Canada pour la prévention de l'entérite nécrotique sont indiqués dans le tableau IV ("Compendium of Veterinary Products," 2015). Ils sont utilisés en continu pendant tout l'élevage, de l'arrivée des poussins sur la ferme jusqu'au départ des oiseaux vers l'abattoir. La seule exception est l'avilamycine, où son homologation est pour une utilisation pendant 21 jours consécutifs durant la période considérée à risque pour développer des problèmes d'entérite nécrotique ("Compendium of Veterinary Products," 2015)

**Tableau IV.** Antibiotiques homologués en 2015 dans la moulée au Canada pour la prévention de l'entérite nécrotique

Antibiotique	Concentration (ppm)	Temps de retrait (jour)
Avilamycine <sup>1</sup>	15-30	0
Bacitracine	55	0
Narasin	70	0
Virginiamycine	22	0

<sup>1</sup> Temps d'utilisation de 21 jours.

Dans les élevages conventionnels, l'utilisation d'anticoccidiens dans la moulée est largement répandue pour contrôler la coccidiose, un facteur majeur prédisposant à l'entérite nécrotique. Ainsi, deux classes d'anticoccidiens existent sur le marché : les agents chimiques et les ionophores. L'effet des anticoccidiens chimiques est de tuer les coccidies en interagissant avec le métabolisme du parasite (Peek & Landman, 2011). Les ionophores détruisent le parasite en interférant avec le transport de cations monovalents et divalents comme le sodium (Na<sup>+</sup>), le potassium (K<sup>+</sup>) et le calcium (Ca<sup>2+</sup>) (Peek & Landman, 2011). Avec l'utilisation des ionophores, les oiseaux produisent une immunité contre les coccidies car celles-ci peuvent subsister en faible nombre dans l'intestin. Les ionophores possèdent aussi une légère capacité à inhiber la croissance des bactéries à

Gram-positif comme *C. perfringens* (Lanckriet *et al.*, 2010; Martel *et al.*, 2004). Ils peuvent donc avoir un léger effet sur le contrôle de l'entérite nécrotique en agissant directement sur cette bactérie. Le tableau V recense les différents anticoccidiens ajoutés dans la moulée homologués au Canada pour la prévention de la coccidiose ("Compendium of Veterinary Products," 2015).

**Tableau V.** Anticoccidiens ajoutés à la moulée homologués au Canada en 2015 pour la prévention de la coccidiose chez le poulet à griller

Anticoccidien	Classe	Concentration (ppm)	Temps de retrait (jours)
Amprolium	Chimique	125	0
Clopitol	Chimique	125	0
Décoquinate	Chimique	30	0
Diclazuril	Chimique	1	0
Nicarbazin	Chimique	125	4
Robénidine	Chimique	33	6
Zoalène	Chimique	125	0
Ammonium de maduramycine	Ionophore	5	5
Lasalocide sodique	Ionophore	105	0
Monensin	Ionophore	99	0
Narasin	Ionophore	70	0
Salinomycine sodique	Ionophore	60	0
Narasin/Nicarbazin	Ionophore/Chimique	80 (40/40)	4

Le parasite acquiert par contre très rapidement une résistance aux anticoccidiens de la classe des chimiques. Des cas de résistance sont rapportés depuis longtemps à plusieurs endroits dans le monde (Peek & Landman, 2011). La résistance aux ionophores, largement utilisés pour contrôler la coccidiose, est plutôt observée lors de performances diminuées. Cela se traduit par une baisse du gain de poids et une augmentation de la conversion alimentaire (Jenkins *et al.*, 2010). Les rotations et les programmes navettes (*shuttle*) permettent une utilisation d'anticoccidiens à long terme puisque la perte de

sensibilité est en corrélation avec la durée d'exposition à l'anticoccidien (Peek & Landman, 2011). Ces programmes permettent de réduire la durée d'exposition des oiseaux aux anticoccidiens et ainsi ils limitent l'apparition de la résistance à ces produits. Les rotations sont normalement faites à partir d'anticoccidiens, mais l'utilisation de vaccins contre la coccidiose commence à faire son apparition dans ces programmes pour limiter l'apparition de résistance contre les anticoccidiens.

Dans l'élevage avicole sans antibiotique au Canada, l'utilisation d'anticoccidiens est interdite (CFIA, 2011). La coccidiose doit ainsi être contrôlée autrement que par des moyens conventionnels tels les anticoccidiens. Ceci est rendu possible par l'utilisation de vaccins pour procurer une immunisation aux oiseaux face aux coccidies. Les vaccins homologués au Canada pour l'immunisation des poulets contre la coccidiose sont listés dans le tableau VI ("Compendium of Veterinary Products," 2015). Les vaccins existant sur le marché comprennent différentes souches d'*Eimeria* non-atténuées ou atténuées. La pathogénicité des souches vaccinales non-atténuées n'a pas été modifiée en laboratoire. Elles ont pour origine des souches de champs (Peek & Landman, 2011). Les souches atténuées ont quant à elles été manipulées en laboratoire pour réduire leur virulence. Des passages en série dans des embryons de poulets ont permis de créer de nouvelles souches à partir de souches cliniques (Peek & Landman, 2011). Ces nouvelles souches, caractérisées de précoces (*precocious strains*), montrent des périodes prépatentes plus courtes. Leur excrétion dans les fientes est aussi moins élevée et elles montrent des lésions microscopiques moins sévères que les souches originales (Kawazoe *et al.*, 2005). Dans les deux cas, les vaccins permettent d'acquérir une immunité avant que les souches présentes sur la ferme n'infectent les oiseaux.

**Tableau VI.** Vaccins homologués au Canada en 2015 pour l'immunisation des poulets contre la coccidiose

Vaccins	Espèces d' <i>Eimeria</i>	Atténuation	Voies d'administrations	Âges d'administrations (jours)*	Temps de retrait (jours)
Coccivac©-B	<i>E. acervulina</i>	Non-atténué	Vaporisation sur la moulée	1-3 (1)	21
	<i>E. maxima</i>		Eau de boisson	4-14 (10)	
	<i>E. mivati</i>		Vaporisation en cabinet au couvoir	1	
	<i>E. tenella</i>		Vaporisation individuelle dans l'œil	1	
Coccivac©-D	<i>E. acervulina</i>	Non-atténué	Vaporisation sur la moulée	1-3 (1)	21
	<i>E. brunetti</i>		Vaporisation en cabinet au couvoir		
	<i>E. hagani</i>				
	<i>E. maxima</i>		1		
	<i>E. mivati</i>				
	<i>E. necatrix</i>				
	<i>E. praecox</i>				
	<i>E. tenella</i>				
Coccivac©-D2	<i>E. acervulina</i>	Non-atténué	Vaporisation sur la moulée	4	21
	<i>E. brunetti</i>		Vaporisation en cabinet au couvoir		
	<i>E. maxima</i>				
	<i>E. mivati</i>			1	
	<i>E. necatrix</i>				
	<i>E. tenella</i>				
Immucox© for chicken I	<i>E. acervulina</i>	Non-atténué	Eau de boisson	1-5	21
	<i>E. maxima</i>				
	<i>E. necatrix</i>				
	<i>E. tenella</i>				
Immucox© for chicken II	<i>E. acervulina</i>	Non-atténué	Eau de boisson	1-5	21
	<i>E. brunetti</i>				
	<i>E. maxima</i>				
	<i>E. necatrix</i>				
	<i>E. tenella</i>				

\*Âge d'administration recommandé entre parenthèses (jours)

### 3. Les modèles d'études *in vivo* de l'entérite nécrotique

L'entérite nécrotique est une maladie étudiée depuis de nombreuses années. Pour ce faire, les chercheurs ont procédé à des infections expérimentales avec des inoculations *per os* de bouillons de cultures de *C. perfringens* à des oiseaux vivants pour étudier différents aspects de la maladie. Ainsi, la pathogénie, les différents facteurs de risques, les moyens de prévention et les traitements reliés à la maladie ont tous été étudiés à partir de ces modèles expérimentaux (Shojadoost, *et al.*, 2012). Il n'existe pas de modèle d'infection unique et plusieurs variantes sont utilisées pour induire l'entérite nécrotique. Pour être valide, un modèle d'infection expérimentale doit produire des signes cliniques et des lésions avec la sévérité voulue parmi les groupes d'oiseaux infectés et être reproductible.

L'inoculation de groupes d'oiseaux avec *C. perfringens* suite à l'ingestion de litière ou de moulée contaminée ainsi que le gavage de suspensions bactériennes sont des moyens couramment utilisés pour inoculer les oiseaux et induire l'entérite nécrotique, mais avec des résultats variables (Shojadoost, *et al.*, 2012; Uzal, *et al.*, 2015). En effet, il est tout d'abord important de choisir des souches capables d'induire l'entérite nécrotique. Ainsi, les toxinotypes A et C doivent être sélectionnés car les autres toxinotypes n'induisent pas l'entérite nécrotique chez la volaille. De plus, le choix de souches produisant la toxine NetB permet de reproduire l'entérite nécrotique avec une bonne reproductibilité (Keyburn, *et al.*, 2008; Smyth & Martin, 2010; Uzal, *et al.*, 2015). Il a par contre été rapporté que certaines souches ne produisant pas cette toxine sont également aptes à causer des lésions macroscopiques et microscopiques avec la même sévérité que les souches produisant NetB (Cooper & Songer, 2010). Il est aussi à noter que ce ne sont



pas toutes les souches de *C. perfringens* isolée de cas cliniques qui sont capables d'induire l'entérite nécrotique dans les modèles expérimentaux (Lee, *et al.*, 2011). Il est donc essentiel de tester plusieurs souches pour trouver celles permettant de créer des lésions intestinales d'entérite nécrotique dans un modèle *in vivo*.

Cependant, il est difficile de reproduire l'entérite nécrotique chez les oiseaux en effectuant uniquement une inoculation avec la bactérie *C. perfringens* (Lee, *et al.*, 2011; Uzal, *et al.*, 2015). Plusieurs facteurs de risques doivent être considérés pour induire l'entérite nécrotique. Ceux-ci servent à produire un environnement propice à la multiplication bactérienne et à l'invasion intestinale par *C. perfringens*. Ainsi, l'administration d'une haute dose de vaccin vivant non atténué contre la coccidiose induisant des lésions intestinales prédisposant à l'entérite nécrotique est un moyen largement utilisé dans les modèles d'entérite nécrotique (Uzal, *et al.*, 2015). Des modèles utilisant 10 à 24 fois la dose vaccinale recommandée ont été utilisés en synergie avec l'inoculation de *C. perfringens* (Lee, *et al.*, 2011; Shojadoost, *et al.*, 2012; Williams, *et al.*, 2003). De plus, l'administration des coccidies doit être faite au maximum quatre ou cinq jours avant l'infection avec *C. perfringens* (Shojadoost, *et al.*, 2012) pour synchroniser les dommages intestinaux induits par les coccidies avec la colonisation par *C. perfringens* (Uzal, *et al.*, 2015).

En plus d'induire la coccidiose pour reproduire l'entérite nécrotique, les modèles d'infection expérimentaux utilisent aussi des diètes composées d'aliments prédisposant les oiseaux à cette maladie. Ainsi, les aliments contenant une forte teneur en fibres non solubles, tels que le blé, l'orge et le seigle, vont remplacer les rations traditionnelles de maïs (Jia, *et al.*, 2009; Williams, *et al.*, 2003) comme source d'énergie. La source de

protéine de soya sera présente comme dans les moulées traditionnelles, mais la quantité de protéine brute pourra être plus élevée que la normale (Drew, *et al.*, 2004). Certains modèles utilisent aussi de la farine de poisson en petite quantité puisqu'il s'agit d'un facteur de risque qui augmente la quantité de glycine et de méthionine dans les rations (Drew, *et al.*, 2004; Williams, *et al.*, 2003). L'utilisation d'aliments contenant de fortes teneurs en inhibiteur de trypsine comme le tourteau de soya est aussi rapportée pour augmenter les lésions d'entérite nécrotique dans les modèles expérimentaux (Palliyeguru *et al.*, 2011; Shojadoost, *et al.*, 2012).

Outre les modèles d'infection expérimentales *per os*, il existe aussi un modèle d'infection expérimentale de ligatures intestinales en boucles (*intestinal ligated loop*) permettant d'injecter un bouillon de *C. perfringens* directement dans les intestins des oiseaux. Il requiert la création de segments intestinaux ligaturés sous anesthésie générale pour fabriquer des boucles intestinales étanches et indépendantes les unes des autres. Ceci permet d'évaluer les dommages intestinaux de plusieurs inocula différents dans un même oiseau. La littérature scientifique ne fait mention que d'un seul article utilisant cette technique chez le poulet. Timbermont *et al.* (2009) ont testé la capacité de plusieurs souches de *C. perfringens* d'origines différentes à induire des lésions d'entérite nécrotique chez des poulets. Ils ont utilisé des souches provenant de cas d'entérite nécrotique de poulets, de poulets sains ainsi que veaux ayant des problèmes d'entérite nécro-hémorragique. Suite à l'injection des souches en phase stationnaire, ils ont récolté les intestins 10 heures post-inoculation pour analyser en histopathologie les lésions présentes. Seulement 1 poulet sur les 12 utilisés a montré des lésions d'entérite nécrotique 10 heures post-inoculation avec les souches provenant de cas d'entérite

nécrotique (CP48, CP56 et CP61). Ils ont observé de la nécrose des villosités, une abondance de tissu nécrotique et protéique dans la lumière intestinale, une infiltration hétérophilique dans la muqueuse intestinale ainsi que la colonisation des tissus nécrotiques par de larges bâtonnets à Gram-positif. Il y avait donc une faible reproductibilité de la méthode. Cependant, il est rapporté que l'injection de souches en phase stationnaire de croissance n'induit pas de lésions nécro-hémorragiques lors de la standardisation de ce modèle chez le veau (Valgaeren *et al.*, 2013). En comparaison, l'injection de cultures en phase de croissance logarithmique avec poudre de lait, un facteur de risque chez les veaux, a permis d'induire des lésions d'entérite nécro-hémorragique avec plusieurs souches différentes de *C. perfringens*, dont une des souches (CP56) utilisées par Timbermont dans son modèle aviaire. De plus, la récolte des échantillons par Valgaeren était 6 heures post-inoculation, donc 4 heures plus tôt que le modèle utilisé par Timbermont. Alors qu'une seule des 12 boucles injectées avec CP56 en phase stationnaire a induit des lésions d'entérite nécrotique dans le modèle de Timbermont, les 3 boucles injectées dans le modèle de Valgaeren avec la même souche en phase logarithmique et la poudre de lait a induit des lésions macroscopiques qui se sont traduites en nécrose des villosités intestinales avec présence de larges bâtonnets à Gram-positif en histopathologie. Ainsi, la combinaison de poudre de lait avec la souche CP56 en phase logarithmique a permis d'avoir une meilleure reproductibilité de la méthode. La plupart des toxines de *C. perfringens* étant produites en fin de phase logarithmique (Fernandez-Miyakawa, *et al.*, 2007), il est préférable d'injecter les inoculas pendant cette phase pour augmenter la production de toxines et ainsi augmenter la production de dommages intestinaux. Il n'y a que l'entérotoxine (CPE) qui est connue

pour être produite pendant la sporulation, les autres toxines possiblement impliquées dans l'entérite nécrotique comme la toxine  $\alpha$ , NetB ou la toxine  $\beta_2$  sont produites en phase logarithmique (Veshnyakova, *et al.*, 2010). Donc, Timbermont *et al.* (2009) auraient pu utiliser des souches en phase logarithmique pour avoir une meilleure reproductibilité de la méthode. L'utilisation de poudre de lait n'étant pas un facteur de risque pour le développement de l'entérite nécrotique chez le poulet, son utilisation dans un modèle aviaire n'est peut-être pas nécessaire, mais ceci serait à étudier. Donc, ce modèle pourrait être une alternative pour étudier la virulence de différentes souches de *C. perfringens* en nécessitant peu d'oiseaux grâce à l'inoculation de plusieurs souches dans un même oiseau.

L'hypothèse de ce projet est qu'il y a une différence de virulence entre les souches de *C. perfringens* isolées de la ferme avec problèmes d'entérite nécrotique clinique en comparaison des souches en provenance de la ferme sans entérite nécrotique. Le premier objectif du projet est de caractériser les souches de *C. perfringens* de quatre lots consécutifs de ces deux fermes. Ensuite, le second objectif sera de développer un modèle *in vivo* de ligatures intestinales en boucles chez le poulet pour comparer la virulence de des souches de *C. perfringens* caractérisées dans le premier objectif.

## **Chapitre 2. Article**

**A chicken intestinal ligated loop model to study the virulence of *Clostridium perfringens* isolates recovered from antibiotic-free chicken flocks.**

**In preparation, 2015**

**A chicken intestinal ligated loop model to study the virulence  
of *Clostridium perfringens* isolates recovered  
from antibiotic-free chicken flocks.**

Eric Parent<sup>1</sup>, Marie Archambault<sup>2</sup>, Marie-Lou Gaucher<sup>1</sup>, Audrey Charlebois<sup>2</sup>, Patrick  
Burns<sup>3</sup>, Jocelyn Bernier-Lachance<sup>2</sup> and Martine Boulianne<sup>1\*</sup>

*<sup>1</sup>Chair in Poultry Research, Department of Clinical Sciences, Faculty of Veterinary  
Medicine of the Université de Montréal, Canada*

*<sup>2</sup>Centre de Recherche en Infectiologie Porcine et Avicole (CRIPA), Department of  
Pathology and Microbiology, Faculty of Veterinary Medicine of the Université de  
Montréal, Canada*

*<sup>3</sup>Department of Clinical Sciences, Faculty of Veterinary Medicine of the Université de  
Montréal, Canada*

\*Corresponding author:

Tel:

Email:

## Abstract

Necrotic enteritis (NE) is a major problem in antibiotic-free chicken flocks (ABF) and specific strains of *Clostridium perfringens* (CP) are known to induce NE. The objective of this study was to develop a chicken intestinal ligated loop model in order to compare various CP isolates virulence recovered from consecutive ABF with and without NE. Intestinal loops were done surgically in ten anaesthetized specific pathogen free chickens and alternately inoculated with CP isolates or brain heart infusion (BHI) media. Histological lesion scoring was performed for each loop. All strains from NE affected flocks reproduced typical histological NE lesions whereas inoculation of loops with a commensal CP strain or BHI did not. Among strains used, 480h (*netB* and *cpb2* positive) and cp-2003-1256 (*netB* positive) demonstrated mean histological lesion scores significantly higher ( $p < 0.01$ ) than those obtained with a commensal strain or BHI. Strain 39d (*netB* negative, *cpb2* positive) induced NE lesions, even if it was *netB* negative. In loops where villi were colonized with Gram-positive rods, significantly higher ( $p < 0.01$ ) mean histological lesion scores were observed. Results from this study support the hypothesis that colonization of the intestinal mucosa by CP might be a critical step in the pathogenesis of NE. Finally, these results show the importance of controlling virulent CP strains in ABF as a highly virulent strain can be present in consecutive flocks with NE and possibly affect multiple flocks.

**Keywords:** Chicken, necrotic enteritis, *Clostridium perfringens*, experimental model, NetB toxin, genetic diversity, antibiotic-free.

## Introduction

*Clostridium perfringens* type A, a Gram-positive spore-forming and anaerobic bacterium, is the etiological agent of necrotic enteritis in chickens (Bernier, et al., 1977; Timbermont, Lanckriet, Gholamiandehkordi, et al., 2009). The disease is reported as a major problem in antibiotic-free broiler chicken flocks since in-feed antibiotics cannot be used in prevention (Gaucher, et al., 2015; Smith, 2011; Van Immerseel, et al., 2004). Because *C. perfringens* is ubiquitous in the chicken environment and intestinal microflora (Craven, et al., 2003; Craven, et al., 2001), necrotic enteritis control is critical for a sustainable antibiotic-free broiler chicken production (Smith, 2011). *C. perfringens* strains are classified in 5 toxinotypes (A, B, C, D and E), based on the production of 4 major toxins (alpha, beta, epsilon and iota) (Petit, et al., 1999). For many years, alpha toxin was considered as a major virulence factor in necrotic enteritis. However, a *C. perfringens* alpha toxin knock-out mutant from a necrotic enteritis outbreak strain (EHE-NE18) proved to cause necrotic enteritis lesions in chickens (Keyburn, et al., 2006). A new toxin, NetB, was identified in strain EHE-NE18 (Keyburn, et al., 2008) as a critical factor for developing necrotic enteritis. However, pathogenesis of the disease is still not fully understood because *C. perfringens netB* negative strains showed the ability to induce lesions of necrotic enteritis (Cooper & Songer, 2010). The *netB* toxin gene has been widely associated with necrotic enteritis outbreaks because its prevalence in *C. perfringens* isolated from chickens affected by the disease is high (Johansson *et al.*, 2010; Keyburn, Yan, et al., 2010; Martin & Smyth, 2009). However, not all *C. perfringens* strains from poultry affected by necrotic enteritis carry this gene, suggesting other



virulence factors could be involved in the pathogenesis (Cooper & Songer, 2010; Martin & Smyth, 2009).

Necrotic enteritis has been studied in chickens using various *in vivo* infection models. Most of these use a combination of predisposing factors, such as coccidiosis and alimentionation, with broth culture gavage of *C. perfringens* (Al-Sheikhly & Truscott, 1977; Bernier, et al., 1977; Chalmers *et al.*, 2007; Lee, et al., 2011; Uzal, et al., 2015). In these models, the use of multiple *C. perfringens* strains to compare their virulence requires a large amount of birds to obtain significant results. Also, depending on the severity of clinical signs induced by the model, mortality during the infection can be high, thus raising ethical concerns about animal welfare in research. Thus, the development of new infection models requiring fewer animals to study diseases such as necrotic enteritis in chickens, allows researchers to obtain valid results to increase scientific knowledge about diseases and to reduce animal use in research. Intestinal ligated loop models have been used to study clostridial infections in various species such as mice, rabbits and calves (Uzal, et al., 2015; Valgaeren, et al., 2013). Following the surgical procedures to create ligated loop segments, *C. perfringens* strains are injected directly into loops to establish a good contact between the bacteria and intestinal mucosa. Multiple strains can be inoculated in each animal, thus reducing the number of required animals in the experiments by studying multiple factors in a same animal (Valgaeren, *et al.*, 2013). Also, procedures are performed under general anaesthesia to reduce animal pain. In chickens, this model would be more appropriate than gavage inoculations to compare *C. perfringens* strains pathogenicity because fewer animals would be needed, no predisposing factors would be required to induce disease and pain would be controlled by

analgesics. However, the intestinal ligated loop model is poorly described in chickens (Timbermont, Lanckriet, Gholamiandehkordi, et al., 2009) and standardization would be essential to effectively use this model.

A previous study on the impact of antibiotic-free broiler chicken production demonstrated that it is possible to commercially raise broiler chickens without antibiotics or anticoccidials (Gaucher, *et al.*, 2015). However, clinical and subclinical necrotic enteritis were an ongoing challenge in some antibiotic-free broiler chicken farms, whereas other antibiotic-free farms did not experience necrotic enteritis even though they had similar management procedures. Clinical necrotic enteritis had a major negative economic impact on these farms compared to healthy broiler chicken farms. These different clinical profiles could be explained by a difference in pathogenicity of *C. perfringens* isolates present during outbreaks of clinical necrotic enteritis compared to the isolates recovered from healthy broiler chicken flocks of the same age. In order to study the pathogenicity of *C. perfringens* strains from these farms, a reproducible chicken *in vivo* infection model to induce necrotic enteritis is needed (Uzal, *et al.*, 2015). The objective of this study was to develop a new chicken intestinal ligated loop model to study the pathogenicity of various *C. perfringens* isolates recovered from antibiotic-free chicken flocks with and without necrotic enteritis.

## **Materials and Methods**

***Clostridium perfringens* isolation.** *C. perfringens* isolates were kindly provided by Dr. Marie-Lou Gaucher (Chair in Poultry Research, Faculty of Veterinary Medicine of the University of Montreal). They are part of a *C. perfringens* culture collection from a year-

long field research project where antibiotic-free broiler chicken flock performances were compared to those of conventionally raised ones (Gaucher, *et al.*, 2015). Isolates from fresh chicken droppings collected at 21 days of age from 4 consecutive flocks in two different antibiotic-free farms were selected for further characterization. The first farm (necrotic enteritis positive farm, NE+) experienced clinical necrotic enteritis outbreaks every growout whereas the second farm (necrotic enteritis negative farm, NE-) had no single necrotic enteritis outbreak for the same production periods. The number of isolates recovered per flock is described in Table 1. Farms were located on different sites, but were owned by the same company, hence with similar chick origin and similar health and production management.

**Toxinotyping by PCR.** All isolates from the NE+ and NE- farms were typed using a multiplex PCR as previously described (Charlebois *et al.*, 2012) for the detection of toxin genes *cpa* (alpha), *cpb* (beta), *etx* (epsilon), *Ia* (iota), *cpb2* (beta-2), and *cpe* (enterotoxin). In addition, a uniplex PCR was used for the detection of toxin genes *netB* (NetB) and *tpeL* (TpeL) (Keyburn, *et al.*, 2008). *C. perfringens* type E (AHL#155, positive for *cpa*, *iA*, *cpe* and *cpb2* genes), *C. perfringens* type B (AHL#156, positive for *cpa*, *cpb* and *etx*) and *C. perfringens* type A (cp-2003-1256, positive for *netB* and *tpeL*) were used as positive controls. Briefly, Chelex 100 (Bio-Rad, Mississauga, Ontario, Canada) with the ebullition method was used for DNA extraction. Many loops of pure colonies of isolates were mixed with 10% Chelex then boiled for 20 minutes, the recovered supernatant containing the DNA for the PCR assays. Each reaction of multiplex PCR was constituted of 2.5µL of 10X PCR Buffer, 1.5U of TAQ polymerase and primer sets for *cpa*, *cpb*, *etx*,

*iA*, *cpb2* and *cpe*. For each PCR for *netB* and *tpeL*, the reaction consisted of 2.5 µL of 10X PCR Buffer, 0.75U of TAQ polymerase and primer sets for *netB* and *tpeL*.

**Pulsed field gel electrophoresis.** *C. perfringens* isolates were grown overnight at 37°C under anaerobic conditions on blood agar plates. A homogenous suspension of bacteria in SE (75 mM NaCl, 25 mM EDTA, pH 8) with a final OD of 1.30 at 600 nm was prepared. A volume of 1.8 mL of this suspension was mixed with 200 µL of 37% formaline (Sigma-Aldrich, St-Louis, MO, USA) and incubated at room temperature for 1 h to neutralize endonucleases. Suspensions were centrifuged at 13,000 rpm for 4 min and pellets were resuspended 3 times in 950 µL of 0.85% NaCl. After the third wash, pellets were resuspended in 490 µL of 0.85% NaCl and embedded in 0.8% chromosomal-grade agarose (Seakem Gold Agarose, Lonza, Rockland, ME, USA). Agarose was prepared with TE buffer (10mM Tris, 100mM EDTA, pH 8). The mixed suspensions were allowed to solidify at 4°C in a mould for 30 min. Then, 1.5 mm thick plugs were incubated in a shaking waterbath at 37°C for 5 h in 2.5 mL of TE and 25 mg/mL of lysozyme (Fisher Scientific, New Jersey, USA). Subsequently, plugs were washed in 5 mL of TE for 15 min at 50°C in waterbath and subsequently incubated overnight in waterbath at 50°C with a 2.5 mL solution of 0.5 M of EDTA, 1% of Sarcosyl (Sigma-Aldrich, St-Louis, MO, USA) and 2 mg/mL of proteinase K (Fisher Scientific, New Jersey, USA) at pH 8. Thereafter, plugs were washed 5 times at 50°C in 5 mL of washing buffer (10 mM Tris, 1 mM EDTA, pH 8). Finally, plugs were equilibrated in 200 µL of restriction buffer at room temperature for 20 min. Then, 100U of restriction enzyme *SmaI* (NewEnglands Biolabs, Ipswich, MA) was added to the restriction buffer and plugs were digested in this

suspension for 5 h at room temperature. Electrophoresis was performed in a 1% SeaKem Gold Agarose gel with 0.5x TBE buffer (1x = 10.78 gr Tris, 5.5 gr borate, 0.58 gr EDTA in 1 L of distilled water, pH 8). Gels were run in 2.5 L of 0.5x TBE and 38 mg thiourea (Fisher Scientific, New Jersey, USA) at 14°C for 19 h using a Bio-Rad CHEF-Dr® III electrophoresis unit (Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA). Pulse times starting at 4 sec and ending at 38 sec, with linear ramping and a field of 6V/cm and an angle of 120° were used. Following electrophoresis, the gel was stained in 1 µg/mL of aqueous ethidium bromide for 45 min, destained in distilled water for 30 min and then photographed under UV light. Gels were analysed using BioNumerics software v6.6 (Applied Maths, Austin, TX). Band matching was performed using 1.5% position tolerance. Dice similarity index and unweighted pair group method with arithmetic mean (UPGMA) were used for cluster analysis. Strains with a similarity over 95% were considered as a same clone.

**Birds.** All procedures with live animal use were authorized by the Ethical Committee of the Faculty of Veterinary Medicine, University of Montreal ('Comité d'éthique de l'utilisation des animaux'). Specific pathogen free (SPF) leghorn cockerels aged between 5 to 8 weeks were bought from the Fallowfield Laboratory of the Canadian Food Inspection Agency (Nepean, Ontario, Canada). Chickens were housed 2 per cage with *ad libitum* access to water and feed. Birds were selected for intestinal ligated loop experiment at a bodyweight of 1.0 - 1.2 kg, i.e. between 10 and 12 weeks of age. Three cockerels were used for the standardization and validation of the intestinal ligated loop model and 10 cockerels were used for the experiment with data collection.

**Anaesthesia and monitoring.** One chicken per time point was used. Twelve hours prior to surgery, birds were fasted with unlimited access to water. Twenty minutes prior to the induction of anaesthesia, a pre-medication of 1 mg/kg midazolam (Midazolam ®, Sandoz) and 4 mg/kg butorphanol (Torbugesic ®, Wyeth) were intramuscularly administered. Administration of butorphanol was repeated every 4 h to ensure adequate analgesia during the whole procedure. Birds were then induced with an induction mask at 3% isoflurane (Isoflurane USP ®, Pharmaceutical Partners of Canada Inc.) in 100% oxygen. An uncuffed tracheal tube (McCarthy & Sons, Calgary, Canada) was inserted afterwards in the trachea for maintenance of anaesthesia. The tube diameter varied from 2.5 mm to 3.5 mm, depending on tracheal size. Chickens were administered 1.0 L/min of oxygen with 0.9% to 2.5% isoflurane throughout the procedure, depending on desired anaesthesia depth. An intravenous catheter was inserted into the brachial vein for Ringer's lactate administration at a rate of 10-15 mL/kg/hour. Birds were monitored every 15 min for oesophageal temperature, expired CO<sub>2</sub>, heart rate and rhythm, respiratory frequency, O<sub>2</sub> saturation and palpebral reflexes from the induction to the euthanasia. Upon closing the surgical site, the animals were kept anaesthetized for another 7 h.

**Surgical procedure.** Following tracheal intubation and installation of monitoring equipment, feathers under the keel and above the cloaca were gently removed. The abdominal region was then disinfected with a chlorexidine scrub (BD E-Z Scrub 747 ®, Becton Dickinson Inc.) for 5 min. Three passages with gazes of alcohol and chlorexidine were done on the surgical site to sterilize the skin surface. Afterward, a sterile drape was placed on the bird. A `L` shape low mid-line incision was made to expose the intestines.

Briefly, a scalpel was used to do a first incision of the skin and the peritoneum 1 cm caudal to the sternum to 1 cm cranial to the cloaca. Then, a second incision of 3-4 cm perpendicularly to the first incision and starting from the caudal end of the first incision was made on the left side of the abdomen to allow a better exposure of the viscera and air sacs. Sterile gazes humidified with physiological saline were placed on air sacs to avoid dessication and rupture. A Snook spay hook was used to gently pull the intestines taking care not to rupture mesentery vessels and air sacs. In each bird, 9 ligated loops of 2 cm each separated by 0.5 cm buffer zones were surgically made using polyglactin 910 suture material (Vicryl 3-0, Ethicon, USA). Loops were placed in the jejunal and the ileal areas. The mesenteric vessels were gently manipulated in order to avoid post-surgical ischemia of intestinal loops. *C. perfringens* strains and brain heart infusion (BHI) negative controls were injected with a syringe and a 27G needle on the antimesenteric side at a 45° angle. After the inoculation, intestines were gently replaced in the abdominal cavity under the air sacs. The peritoneum and the skin were sutured in two planes. Each of them was sutured using a simple continuous suture pattern with the same suture material as for the creation of the intestinal loops.

### ***C. perfringens* strain selection and preparation for the intestinal ligated loop model.**

A total of four different strains were selected among the 133 strains from both farms. A summary of their characteristics is shown in Table 2. Also, a *C. perfringens* strain used regularly in our *in vivo* infection model assays, cp-2003-1256 (Chair in Poultry research, University of Montreal), was selected as a positive control. Negative controls consisted of brain heart infusion (BHI) inoculates and sterile culture media used for *C. perfringens* cultures. A suspension of 0.10 mL of BHI containing  $1 \times 10^6$  CFU of *C. perfringens* in

logarithmic phase was injected in each loop. A growth curve based on the optical density (OD) was performed in brain heart infusion (BHI) for each strain to identify the OD at 600 nm corresponding to the mid-log growth phase. First, 20  $\mu$ L of an overnight culture in BHI of each strain was diluted in 5 mL of fresh BHI (dilution 1:250). The dilutions were then placed in an anaerobic cabinet for 6 h to allow the cultures to reach the mid-log growth phase. After incubation, the cultures were removed from the cabinet and a sample was taken to ensure the OD at 600nm was between 1.000 to 1.200 for each strain. Then, 1 mL was transferred in an eppendorf tube for centrifugation (4 min at 13 000 rpm). The supernatant was removed and 0.10 mL of fresh BHI was added to pellets. The suspension was homogenized and transferred in a syringe of 1 mL for injection in loops. A volume of 0.10 mL of a sterile suspension of fresh BHI was transferred in syringes of 1 mL as negative controls. Prepared inoculates were finally placed on ice during transportation to the surgery room.

**Intestinal ligated loop infection design.** In a same bird, five loops were used to inoculate the selected strains and four loops were inoculated with the control BHI (Figure 1). Between two loops injected with strains, there was always a loop injected with BHI to ensure no cross-contamination between loops. Moreover, buffer zones were created between every loop injected with a strain or BHI. The five selected strains were used in every bird, with a random loop assignment for the strains in the injected loops. BHI control loops were not randomly assigned as these were used in histopathology to ensure no necrotic enteritis lesion was present between the loops injected with *C. perfringens* strains.



**Intestinal loop sampling.** Seven hours post-infection, chickens were euthanized by cervical dislocation while still under general anaesthesia. Sections of every collected intestinal loop were fixed in 10% phosphate-buffered formalin for at least 24 hours. Elapsed time between euthanasia and fixation in formaline was under 15 min. Intestinal content was also recovered for further analysis, by PFGE and PCR as previously described, of the *C. perfringens* strains harvested 7 h post-infection to ensure the recovered strain was the same as the one inoculated.

**Histopathologic lesion scoring of intestinal loops.** Fixed intestinal loops were embedded in paraffin. Sections of 5 µm were cut and stained with HPS (haematoxylin-phloxine-saffron). Histological lesion scoring of the intestinal samples was performed using standard light microscopy (BX51, Olympus Optical Co., Ltd, Japan). An area of each intestinal section containing five villi without preparation artifacts was randomly selected for histological scoring. Firstly, observations were done at low magnification (100x) for the five villi. Then, one villus among the five villi was randomly selected for evaluation at higher magnification (400x). Table 3 describes the scores attributed to each microscopical lesion observed for 100x and 400x magnifications. Each intestinal loop was blindly evaluated using this grid. Six histological changes were assessed to quantify intestinal lesions associated to necrotic enteritis: villi fusion; necrotic, haemorrhagic and proteinaceous material in lumen; heterophilic infiltration in the lamina propria; and villi tips necrosis (Figure 2). The addition of these scores for a loop gave a quantitative total lesion score per loop. Total lesion scores were firstly grouped and analyzed per *C. perfringens* strain injected in the loops. Secondly, scores were analyzed depending on the

location of Gram-positive rods seen on microscopic evaluation. For this purpose, three new groups were made (Table 4); Group 0: No Gram-positive rods observed; Group 1: Gram-positive rods observed in the intestinal content only; Group 2: Gram-positive rods observed in the intestinal content and also adhered to the mucosa. Control loops injected with the control BHI were not included in this analysis because no Gram-positive rod was observed by microscopic evaluation. Loops showing coagulation necrosis due to lack of vascularisation were not included in the analysis.

**Statistical analysis.** Average total histological scores were analyzed using the proc mixed procedure in SAS v9.4. A repeated measures ANOVA was performed, the 10 birds being the repetition unit. Tukey post-hoc test was used to examine differences in average total histological scores across groups.

## **Results**

**Toxinotyping by PCR.** From the NE+ farm, all isolates were toxinotype A whereas 95% and 79% of the isolates were positive for *netB* and *cpb2* toxin genes, respectively. For the NE- farm, 83% of the isolates were toxinotype A whereas 17% of the isolates belonged to toxinotype E, as two isolates were positive for *Ia* toxin gene. All isolates from this farm were negative for *netB* toxin gene whereas 25% were positive for *cpb2* toxin gene. No other tested toxin gene (*cpb*, *etx*, *cpe*, and *tpel*) was detected by PCR for both farms.

**Pulsed field gel electrophoresis.** Twelve different clones were identified in both farms, based on a dendrogram similarity over 95% and a same visual PFGE profile (Figure 3).

There was no clone common between isolates recovered from the NE+ and the NE- farms. Eight clones among 88 typed isolates were identified in the NE+ farm whereas 4 clones were identified among the 6 typed isolates from the NE- farm. A total of 94 of the 133 isolates were successfully typed (71%) using the restriction endonuclease *SmaI*. Due to DNA degradation, 39 isolates were untypable (29%). Clone 3 from the NE+ farm was the only one identified in more than one flock (Figure 4). It was also the most frequently observed clone among all isolates, represented in 48 of the 94 typed isolates. This clone was persistent for the first 3 consecutive flocks (A, B and C) and was not identified among the flock D isolates of this farm. However, the clones 1 and 2 from flock D had only two different restriction fragments compared to clone 3 (Figure 3). Flock A from the NE+ farm showed the highest clone diversity among the 4 consecutive flocks of this farm (Figure 4). Five different PFGE profiles were identified whereas we identified one clone in flocks B and C. In flock D, three different clones were identified. In the NE- farm, only 6 isolates were typed out of the 12 isolates recovered. Four different PFGE profiles were identified from these typed isolates (Figure 5).

**Histopathology.** Our model successfully reproduced necrotic enteritis with various degrees of intestinal damage being observed in inoculated intestinal loops. There was a significant difference ( $p < 0.01$ ) between the average total lesion scores of loops injected with strains 480h or cp-2003-1256 compared to those injected with BHI or the strain ca111b (Figure 6). Average total lesion scores of the strains 39d and 74a did not differ significantly from any of the other strains. When looking at average total lesion scores versus Gram-positive rods location, group 2 was significantly higher ( $p < 0.01$ ) than

groups 1 and 0 (Figure 7). Typical lesions of necrotic enteritis were observed 7 hours post-infection in loops injected with strains 480h, 74a, 39d from the NE+ farm as well as cp-2003-1256, the positive control strain. These lesions consisted of severe coagulation necrosis of the mucosa (Figure 8b), heterophilic inflammation and colonization of necrotic tissues by Gram-positive rods (Figure 8a). Less severe lesions characterized by villus tips necrosis and heterophilic infiltration in the mucosa but absence of severe coagulation necrosis of the mucosa were also observed in the loops injected with these strains (Figures 8c and 8d). Loops injected with BHI controls or ca111b showed no necrotic lesion to the villi. Mild heterophilic infiltration was occasionally seen, but without damage to the intestinal mucosa. Despite special care to protect mesentery vessels during the surgical procedures, a small number of loops showed a marked congestion of the serosa and blood vessels upon closure of the coelomic cavity. Adjacent loops were not showing these signs when present. Histopathology of these intestinal loops 7 hours post-inoculation showed transmural vascular congestion and generalized coagulation necrosis of the mucosa not related to necrotic enteritis. Loops with such vascular changes were excluded from the statistical analysis. One bird was excluded from the analysis due to post-surgical vascular congestion of all intestinal loops. Finally, a moderate to marked heterophilic infiltration in the serosa and the longitudinal muscle layer of the *muscularis externa* was commonly seen in the majority of the intestinal loops.

## Discussion

Our newly developed intestinal ligated loop model successfully reproduced necrotic enteritis in chickens only with strains recovered from necrotic enteritis outbreaks. No microscopic lesion of necrotic enteritis was observed following administration of the strain recovered from a healthy flock (ca111b, flock D, NE- farm) whereas strains recovered from necrotic enteritis outbreaks (480h, flock B, NE+ farm; 74a and 39d, flock A, NE+ farm; cp-2003-1256, positive control) induced various degrees of necrotic enteritis lesions. The use of strains recovered from clinical outbreaks of necrotic enteritis was essential to reproduce the disease in this model, as reported in other infection models of necrotic enteritis in chickens (Cooper & Songer, 2010; Timbermont, Lanckriet, Gholamiandehkordi, et al., 2009). Insertion of BHI control loops between each inoculated loop was necessary to minimize risk of cross-contamination between contiguous loops. Necrotic enteritis lesions in strain inoculated loops adjacent to intact BHI loops indicated that multiple strains could be studied in the same chicken with our model.

Previous reports have shown that the *netB* toxin gene of *C. perfringens* is important to reproduce necrotic enteritis in experimental infection models (Keyburn, et al., 2008; Smyth & Martin, 2010). Interestingly our *netB*-negative strain 39d from the NE+ farm induced typical NE lesions and this was also reported in another experimental infection model (Cooper & Songer, 2010). In comparison, strain 74a (*cpb2+*, *netB+*) from the same flock and with an identical PFGE profile had comparable average total lesion scores. To our knowledge, it is the first study reporting that two different strains, one *netB*- and one *netB+* but with an indistinguishable PFGE profile, can both induce

necrotic enteritis lesions in an infection model. It would be interesting to further investigate this observation with the creation of a *netB* mutant to assess the virulence of these two strains. Our results suggest there might be other virulence factors than *netB* involved in the pathogenesis of necrotic enteritis. Only strains 480h (*cpb2+*, *netB+*) and cp-2003-1256 (*cpb2-*, *netB+*) showed significantly higher total histological scores when compared to strain ca111b (*cpb2-*, *netB-*) and BHI control. Only 9 birds were used to compare the virulence of the 5 *C. perfringens* strains since one was retired from the study due to coagulation disorders encountered during surgery. Increase in bird repetitions could decrease standard deviation of each group and hence increase statistical power to enable better discrimination of moderate lesion scores from high and low total histological lesion scores. Since *C. perfringens* virulent strain can show variability in gross lesion scores (Cooper & Songer, 2010; Smyth & Martin, 2010), increasing number of repetitions would be necessary to compare strains virulence with a microscopic lesion scoring system.

An interesting microscopic finding was the positive association between large Gram-positive rods located on the intestinal mucosa and higher total histological lesion scores. This suggests possible host-pathogen interaction, such as *C. perfringens* adherence to chicken intestinal mucosa, might be an important step in the pathogenesis of necrotic enteritis. Close contact of *C. perfringens* with Caco-2 intestinal cells has been reported to upregulate the production of beta toxin and perfringolysin (Ma, et al., 2011; Vidal, et al., 2009) and this contact could possibly be required to upregulate the production of toxins involved in chicken necrotic enteritis. It has been reported that VirR/VirS two-component system is required by *C. perfringens* to upregulate production of the various toxins

(Ohtani & Shimizu, 2015). For instance, NetB toxin production is under regulation of this system (Cheung, et al., 2010). A possible stimulus such as *C. perfringens* attachment to intestinal cells mucosa might therefore trigger a toxin regulation system like the VirR/VirS two-component system to upregulate toxin production such as NetB or other cytotoxic toxins. Further research on possible adherence factors of *C. perfringens* to intestinal cells is required to study the association between attachment of the bacteria to the intestinal mucosa and the production of necrotic enteritis lesions.

While we observed that *netB* toxin gene in a *C. perfringens* strain recovered from a necrotic enteritis outbreak was not essential to reproduce the disease in our intestinal ligated loop model, we observed a high prevalence (95%) of this toxin gene among the isolates recovered from the four consecutive flocks of a farm with recurrent necrotic enteritis outbreaks. This gene is plasmid encoded (Lepp *et al.*, 2010) and can be horizontally transferred by conjugation between *C. perfringens* strains (Bannam *et al.*, 2011). This is a possible explanation for the constantly high *netB* prevalence observed during the 4 consecutive flocks of the NE+ farm. This high *netB* prevalence in birds affected by necrotic enteritis was also observed in various studies (Johansson, et al., 2010; Keyburn, Yan, et al., 2010; Martin & Smyth, 2009). In comparison, *netB* toxin gene was not detected among the 12 isolates from our NE- farm and this might be important to maintain a healthy *C. perfringens* flora in a poultry farm. We detected a high prevalence of *cpb2* toxin gene among the *C. perfringens* isolates from the NE+ farm (79%) compared to the prevalence of this gene in the NE- farm (25%). No epidemiological correlation has been reported between *cpb2* gene presence in a chicken flock and its health status regarding necrotic enteritis (Crespo, et al., 2007; van Asten, et

al., 2010), but some studies question the possible involvement of this toxin in this disease (Allaart *et al.*, 2012; Brady *et al.*, 2010; Cooper & Songer, 2010; Martin & Smyth, 2009). Further laboratory or *in vivo* investigations on this specific toxin, with *cpb2* null mutant experimentations for example, would be necessary to assess the possible role of  $\beta 2$  toxin in necrotic enteritis as only epidemiological observations are currently available.

Low *C. perfringens* genetic diversity has been reported in chicken flocks affected by necrotic enteritis (Chalmers, Bruce, et al., 2008; Engstrom *et al.*, 2003; Gholamiandekhordi, et al., 2006; Nauerby, et al., 2003), with no more than one or two different clones identified during a same necrotic enteritis outbreak. Our results are partially in agreement with this statement, as we identified 1 to 5 different PFGE profiles in each of the 4 consecutive flocks of the NE+ farm. The first flock showed the highest diversity with 5 clones, while only 1 clone was identified in flocks B and C. To our knowledge, it is the first study following clone diversity in a same NE affected chicken barn for consecutive flocks. An interesting finding was the persistence of clone 3 in three consecutive flocks (A, B and C) of the NE+ farm. Moreover, clones 1 and 2 from flock D had only 2 restriction fragments different from clone 3, making them closely related to clone 3 based on Tenover criteria (Tenover *et al.*, 1995). Strain 480h was randomly chosen among isolates from clone 3 to assess its virulence in our intestinal ligated loop model and showed a high potential to induce severe necrotic enteritis lesions. Thus, this strain had two characteristics making it dangerous for long-term antibiotic-free chicken production: its persistence in consecutive chicken flocks and its high virulence in an *in vivo* infection model. According to these results, sustainable antibiotic-free broiler chicken production might be dependant of the *C. perfringens* population in a farm,



because a highly virulent strain can be recovered from chicken droppings in consecutive flocks affected by necrotic enteritis. Barbara *et al.* (2008) already reported virulent strains could displace the normal gut *C. perfringens* flora in an *in vivo* infection model, thus providing a possible explanation for a predominant virulent strain in bird droppings hence explaining the high prevalence of one clone in a necrotic enteritis outbreak. Also, clone 5 from our NE+ farm was highly prevalent in flock A and for an unknown reason, we did not identify this clone in the subsequent flocks. Timbermont *et al.* (2009) reported that some virulent *C. perfringens* strains have the *in vitro* ability to inhibit the growth of other strains and they identified a bacteriocin named Perfrin in those strains (Timbermont, *et al.*, 2014). The purified bacteriocin however showed a lower inhibitory spectrum than the original *C. perfringens* strains from which it was purified. Thus, it is tempting to speculate that bacteriocin production by clone 3 could explain the disappearance of clone 5 after the first flock but further research would be needed to identify possible factors that allowed clone 3 to be predominant in chickens' droppings for 3 consecutive flocks. Our results suggest low *C. perfringens* genetic diversity in necrotic enteritis outbreaks could be the result of a highly virulent clone with the ability to persist and to predominate in the chicken intestinal flora over other *C. perfringens* clones.

Based on our results, *C. perfringens* diversity in the NE- farm is hard to evaluate because of a poor PFGE typing rate. Firstly, no isolate have been recovered from healthy flocks B and C from this farm, as previously reported in other healthy flocks (Chalmers, Martin, Hunter, *et al.*, 2008). Also, only 6 of the 12 isolates were successfully typed using the *smal* restriction enzyme because of DNA degradation. Therefore, only partial information about *C. perfringens* isolates from this farm could be analyzed. From the 6

isolates with a successful PFGE profile, there was a high genetic diversity with 4 different clones identified. This finding is in accordance with the high genetic diversity normally seen in healthy broiler chickens (Gholamiandekhordi, *et al.*, 2006; Nauerby, *et al.*, 2003). Finally, 2 isolates recovered from the flock A of the NE- farm were carrying *Ia* toxin gene. This uncommon finding, also reported in chickens fed organic diet (Brady, *et al.*, 2010), may be a sign of high genetic diversity and absence of clinical signs of NE on this farm.

In conclusion, this study developed an intestinal ligated loop model for chicken necrotic enteritis, characterized by villi necrosis, heterophilic inflammation, villi fusion and accumulation of necrohemorrhagic or proteinaceous material in the lumen 7 hours post-infection. Difference in virulence was noted between highly virulent and commensal strains of *C. perfringens*. Also, a *netB*-negative strain had the ability to induce necrotic enteritis lesions, thus showing *netB* can be an important virulence factor, but not essential, for *C. perfringens* in necrotic enteritis. This study also brings an insight into the association between adherence of the mucosa by large Gram-positive rods and more severe lesions of necrotic enteritis, which suggests *C. perfringens* adherence to intestinal mucosa might be an important step in the pathogenesis of necrotic enteritis. Finally, the most virulent strain studied in this intestinal ligated loop model showed persistence throughout consecutive flocks affected by necrotic enteritis and this is a major problem for sustainable antibiotic-free broiler chicken production since a same virulent strain can possibly cause necrotic enteritis in consecutive flocks in a same poultry barn. In order to achieve large scale antibiotic-free broiler chicken production, it is essential to put in place control strategies over those virulent and persistent *C. perfringens* strains.

## Acknowledgments

This work was supported by the Chair in Poultry Research (M. Boulianne) from the Faculté de médecine vétérinaire of the Université de Montréal, and supported in part by the Natural Sciences and Engineering Research Council (NSERC) of Canada (M. Archambault, RGPIN-191461).

## References

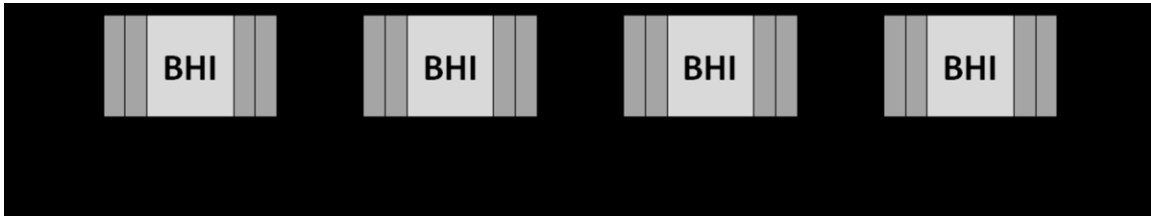
- Al-Sheikhly, F. & Truscott, R.B. (1977). The pathology of necrotic enteritis of chickens following infusion of broth cultures of *Clostridium perfringens* into the duodenum. *Avian Dis*, 21, 230-240.
- Allaart, J.G., de Bruijn, N.D., van Asten, A.J., Fabri, T.H. & Grone, A. (2012). NetB-producing and beta2-producing *Clostridium perfringens* associated with subclinical necrotic enteritis in laying hens in the Netherlands. *Avian Pathol*, 41, 541-546. doi: 10.1080/03079457.2012.729809
- Bannam, T.L., Yan, X.X., Harrison, P.F., Seemann, T., Keyburn, A.L., Stubenrauch, C., *et al.* (2011). Necrotic enteritis-derived *Clostridium perfringens* strain with three closely related independently conjugative toxin and antibiotic resistance plasmids. *MBio*, 2. doi: 10.1128/mBio.00190-11
- Barbara, A.J., Trinh, H.T., Glock, R.D. & Glenn Songer, J. (2008). Necrotic enteritis-producing strains of *Clostridium perfringens* displace non-necrotic enteritis strains from the gut of chicks. *Vet Microbiol*, 126, 377-382. doi: 10.1016/j.vetmic.2007.07.019
- Bernier, G., Phaneuf, J.B. & Filion, R. (1977). [Necrotic enteritis in broiler chickens. III. Study of the factors favoring the multiplication of *Clostridium perfringens* and the experimental transmission of the disease]. *Can J Comp Med*, 41, 112-116.
- Brady, J., Hernandez-Doria, J.D., Bennett, C., Guenter, W., House, J.D. & Rodriguez-Lecompte, J.C. (2010). Toxinotyping of necrotic enteritis-producing and commensal isolates of *Clostridium perfringens* from chickens fed organic diets. *Avian Pathol*, 39, 475-481. doi: 10.1080/03079457.2010.521141
- Chalmers, G., Bruce, H.L., Hunter, D.B., Parreira, V.R., Kulkarni, R.R., Jiang, Y.F., *et al.* (2008). Multilocus sequence typing analysis of *Clostridium perfringens* isolates from necrotic enteritis outbreaks in broiler chicken populations. *J Clin Microbiol*, 46, 3957-3964. doi: 10.1128/jcm.01548-08
- Chalmers, G., Bruce, H.L., Toole, D.L., Barnum, D.A. & Boerlin, P. (2007). Necrotic enteritis potential in a model system using *Clostridium perfringens* isolated from field outbreaks. *Avian Dis*, 51, 834-839. doi: 10.1637/7959-022807-REGR.1
- Chalmers, G., Martin, S.W., Hunter, D.B., Prescott, J.F., Weber, L.J. & Boerlin, P. (2008). Genetic diversity of *Clostridium perfringens* isolated from healthy broiler chickens at a commercial farm. *Vet Microbiol*, 127, 116-127. doi: 10.1016/j.vetmic.2007.08.008
- Charlebois, A., Jalbert, L.A., Harel, J., Masson, L. & Archambault, M. (2012). Characterization of genes encoding for acquired bacitracin resistance in *Clostridium perfringens*. *PLoS One*, 7, e44449. doi: 10.1371/journal.pone.0044449
- Cheung, J.K., Keyburn, A.L., Carter, G.P., Lanckriet, A.L., Van Immerseel, F., Moore, R.J., *et al.* (2010). The VirSR two-component signal transduction system regulates NetB toxin production in *Clostridium perfringens*. *Infect Immun*, 78, 3064-3072. doi: 10.1128/IAI.00123-10
- Cooper, K.K. & Songer, J.G. (2010). Virulence of *Clostridium perfringens* in an experimental model of poultry necrotic enteritis. *Vet Microbiol*, 142, 323-328. doi: 10.1016/j.vetmic.2009.09.065

- Craven, S.E., Cox, N.A., Bailey, J.S. & Cosby, D.E. (2003). Incidence and tracking of *Clostridium perfringens* through an integrated broiler chicken operation. *Avian Dis*, 47, 707-711.
- Craven, S.E., Stern, N.J., Bailey, J.S. & Cox, N.A. (2001). Incidence of *Clostridium perfringens* in broiler chickens and their environment during production and processing. *Avian Dis*, 45, 887-896.
- Crespo, R., Fisher, D.J., Shivaprasad, H.L., Fernandez-Miyakawa, M.E. & Uzal, F.A. (2007). Toxinotypes of *Clostridium perfringens* isolated from sick and healthy avian species. *J Vet Diagn Invest*, 19, 329-333.
- Engstrom, B.E., Fermer, C., Lindberg, A., Saarinen, E., Baverud, V. & Gunnarsson, A. (2003). Molecular typing of isolates of *Clostridium perfringens* from healthy and diseased poultry. *Vet Microbiol*, 94, 225-235.
- Gaucher, M.L., Quessy, S., Letellier, A., Arsenault, J. & Boulianne, M. (2015). Impact of a drug-free program on broiler chicken growth performances, gut health, *Clostridium perfringens* and *Campylobacter jejuni* occurrences at the farm level. *Poult Sci*. doi: 10.3382/ps/pev142
- Gholamiandekordi, A.R., Ducatelle, R., Heyndrickx, M., Haesebrouck, F. & Van Immerseel, F. (2006). Molecular and phenotypical characterization of *Clostridium perfringens* isolates from poultry flocks with different disease status. *Vet Microbiol*, 113, 143-152. doi: <http://dx.doi.org/10.1016/j.vetmic.2005.10.023>
- Johansson, A., Aspan, A., Kaldhusdal, M. & Engstrom, B.E. (2010). Genetic diversity and prevalence of netB in *Clostridium perfringens* isolated from a broiler flock affected by mild necrotic enteritis. *Vet Microbiol*, 144, 87-92. doi: 10.1016/j.vetmic.2009.12.017
- Keyburn, A.L., Boyce, J.D., Vaz, P., Bannam, T.L., Ford, M.E., Parker, D., *et al.* (2008). NetB, a new toxin that is associated with avian necrotic enteritis caused by *Clostridium perfringens*. *PLoS Pathog*, 4, e26. doi: 10.1371/journal.ppat.0040026
- Keyburn, A.L., Sheedy, S.A., Ford, M.E., Williamson, M.M., Awad, M.M., Rood, J.I., *et al.* (2006). Alpha-toxin of *Clostridium perfringens* is not an essential virulence factor in necrotic enteritis in chickens. *Infect Immun*, 74, 6496-6500. doi: 10.1128/IAI.00806-06
- Keyburn, A.L., Yan, X.X., Bannam, T.L., Van Immerseel, F., Rood, J.I. & Moore, R.J. (2010). Association between avian necrotic enteritis and *Clostridium perfringens* strains expressing NetB toxin. *Vet Res*, 41, 21. doi: 10.1051/vetres/2009069
- Lee, K.W., Lillehoj, H.S., Jeong, W., Jeoung, H.Y. & An, D.J. (2011). Avian necrotic enteritis: experimental models, host immunity, pathogenesis, risk factors, and vaccine development. *Poult Sci*, 90, 1381-1390. doi: 10.3382/ps.2010-01319
- Lepp, D., Roxas, B., Parreira, V.R., Marri, P.R., Rosey, E.L., Gong, J., *et al.* (2010). Identification of novel pathogenicity loci in *Clostridium perfringens* strains that cause avian necrotic enteritis. *PLoS One*, 5, e10795. doi: 10.1371/journal.pone.0010795
- Ma, M., Vidal, J., Saputo, J., McClane, B.A. & Uzal, F. (2011). The VirS/VirR two-component system regulates the anaerobic cytotoxicity, intestinal pathogenicity, and enterotoxemic lethality of *Clostridium perfringens* type C isolate CN3685. *MBio*, 2, e00338-00310. doi: 10.1128/mBio.00338-10
- Martin, T.G. & Smyth, J.A. (2009). Prevalence of netB among some clinical isolates of *Clostridium perfringens* from animals in the United States. *Vet Microbiol*, 136, 202-205. doi: 10.1016/j.vetmic.2008.10.026
- Nauerby, B., Pedersen, K. & Madsen, M. (2003). Analysis by pulsed-field gel electrophoresis of the genetic diversity among *Clostridium perfringens* isolates from chickens. *Vet Microbiol*, 94, 257-266.
- Ohtani, K. & Shimizu, T. (2015). Regulation of toxin gene expression in *Clostridium perfringens*. *Res Microbiol*, 166, 280-289. doi: 10.1016/j.resmic.2014.09.010
- Petit, L., Gibert, M. & Popoff, M.R. (1999). *Clostridium perfringens*: toxinotype and genotype. *Trends Microbiol*, 7, 104-110.
- Smith, J.A. (2011). Experiences with drug-free broiler production. *Poult Sci*, 90, 2670-2678. doi: 10.3382/ps.2010-01032
- Smyth, J.A. & Martin, T.G. (2010). Disease producing capability of netB positive isolates of *C. perfringens* recovered from normal chickens and a cow, and netB positive and negative isolates from chickens with necrotic enteritis. *Vet Microbiol*, 146, 76-84. doi: 10.1016/j.vetmic.2010.04.022
- Tenover, F.C., Arbeit, R.D., Goering, R.V., Mickelsen, P.A., Murray, B.E., Persing, D.H., *et al.* (1995). Interpreting chromosomal DNA restriction patterns produced by pulsed-field gel electrophoresis: criteria for bacterial strain typing. *J Clin Microbiol*, 33, 2233-2239.

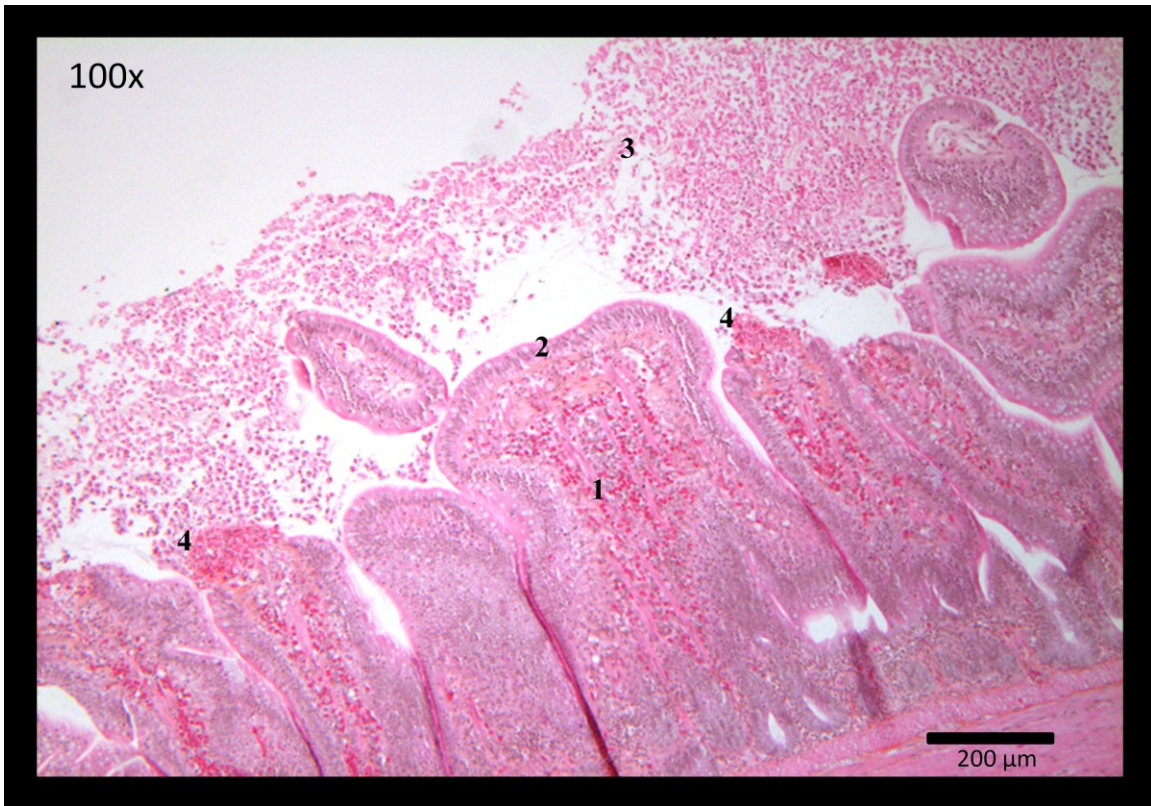
- Timbermont, L., Lanckriet, A., Gholamiandehkordi, A., R.Pasmans, F., Martel, A., Haesebrouck, F., *et al.* (2009). Origin of *Clostridium perfringens* isolates determines the ability to induce necrotic enteritis in broilers. *Comp Immunol Microbiol Infect Dis*, 32, 503-512. doi: 10.1016/j.cimid.2008.07.001
- Timbermont, L., Lanckriet, A., Pasmans, F., Haesebrouck, F., Ducatelle, R. & Van Immerseel, F. (2009). Intra-species growth-inhibition by *Clostridium perfringens* is a possible virulence trait in necrotic enteritis in broilers. *Vet Microbiol*, 137, 388-391. doi: 10.1016/j.vetmic.2009.01.017
- Uzal, F.A., McClane, B.A., Cheung, J.K., Theoret, J., Garcia, J.P., Moore, R.J., *et al.* (2015). Animal models to study the pathogenesis of human and animal *Clostridium perfringens* infections. *Vet Microbiol*. doi: 10.1016/j.vetmic.2015.02.013
- Valgaeren, B., Pardon, B., Goossens, E., Verherstraeten, S., Schauvliege, S., Timbermont, L., *et al.* (2013). lesion development in a new intestinal loop model indicates the involvement of a shared *Clostridium perfringens* virulence factor in haemorrhagic enteritis in calves. *J Comp Pathol*, 149, 103-112. doi: 10.1016/j.jcpa.2012.11.237
- van Asten, A.J., Nikolaou, G.N. & Grone, A. (2010). The occurrence of cpb2-toxigenic *Clostridium perfringens* and the possible role of the beta2-toxin in enteric disease of domestic animals, wild animals and humans. *Vet J*, 183, 135-140. doi: 10.1016/j.tvjl.2008.11.005
- Van Immerseel, F., De Buck, J., Pasmans, F., Huyghebaert, G., Haesebrouck, F. & Ducatelle, R. (2004). *Clostridium perfringens* in poultry: an emerging threat for animal and public health. *Avian Pathol*, 33, 537-549. doi: 10.1080/03079450400013162
- Vidal, J.E., Ohtani, K., Shimizu, T. & McClane, B.A. (2009). Contact with enterocyte-like Caco-2 cells induces rapid upregulation of toxin production by *Clostridium perfringens* type C isolates. *Cell Microbiol*, 11, 1306-1328. doi: 10.1111/j.1462-5822.2009.01332.x

## Figures

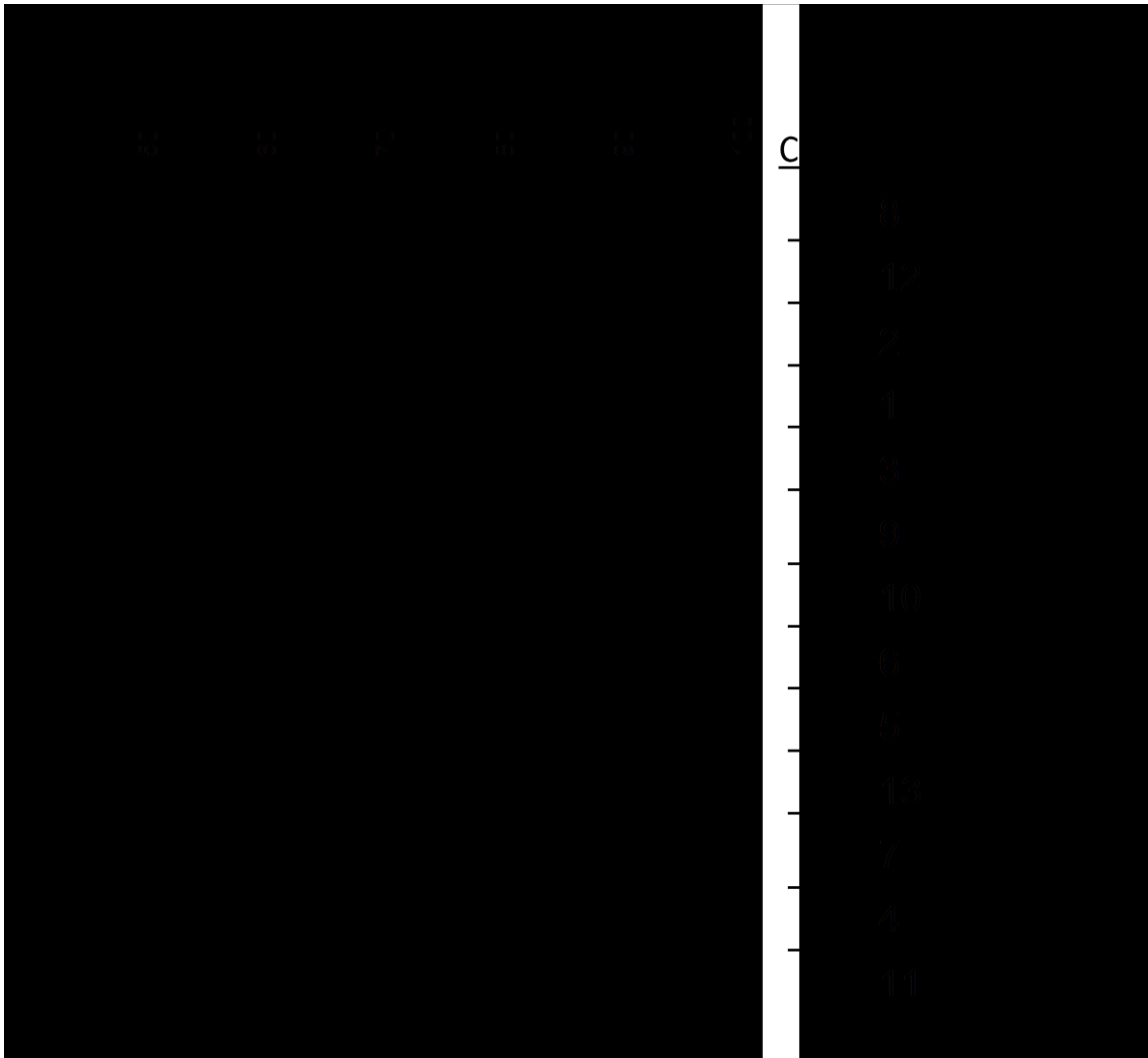
**Figure 1.** *Intestinal ligated loop design for each chicken. Loops labelled 'x' were randomly injected with a C. perfringens strain. 'BHI' loops were injected with sterile suspension of brain heart infusion. A buffer zone of 0.5cm was placed between each injected loop.*



**Figure 2.** Loop injected with strain 39d. Total histological scores based on the addition of 6 histological changes: Heterophilic infiltration in the lamina propria of the mucosa (1); villi fusion (2); necrotic, haemorrhagic and/or proteinaceous material in lumen (3); villi tips necrosis (4). HPS stain.

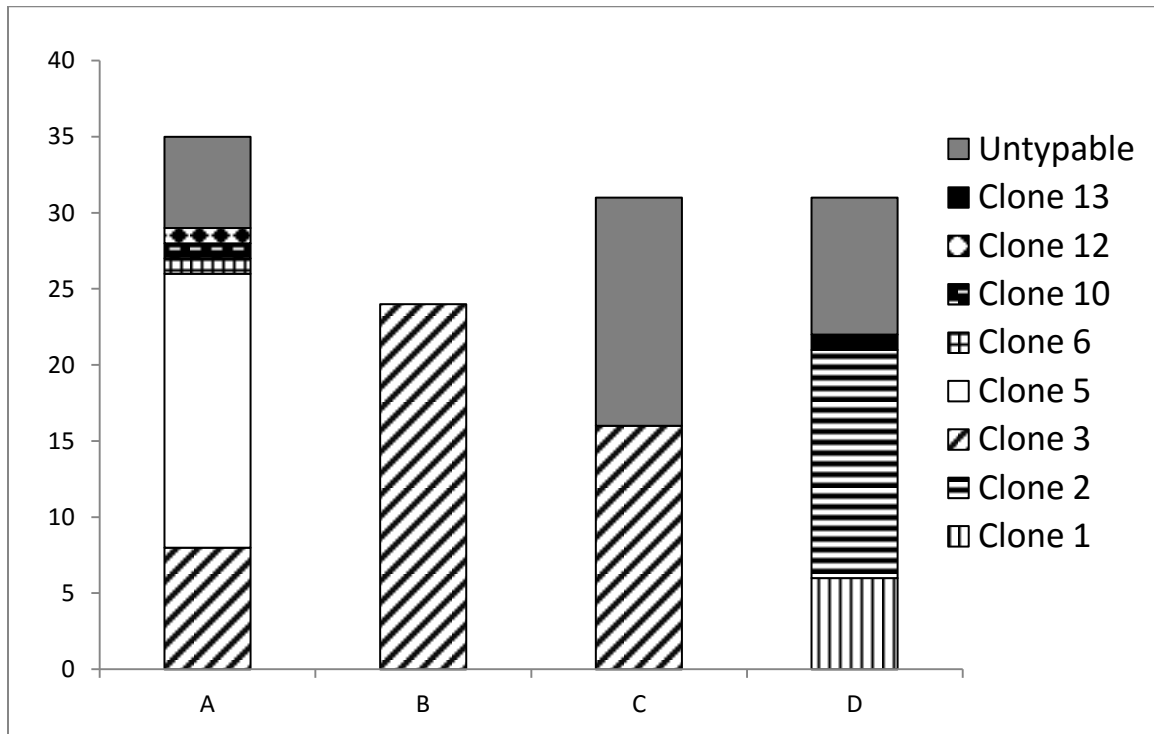


**Figure 3.** *Dendrogram of the 12 different PFGE profiles from the 94 typed isolates obtained by unweighted pair group using arithmetic averages with a Dice coefficient and 1.5% band position tolerance. Isolates with a similarity over 95% and a similar visual band pattern were considered from the same clone. Clone 7 is a Clostridium perfringens strain used as a positive control (cp-2003-1256), for a total of 13 clones in the dendrogram.*

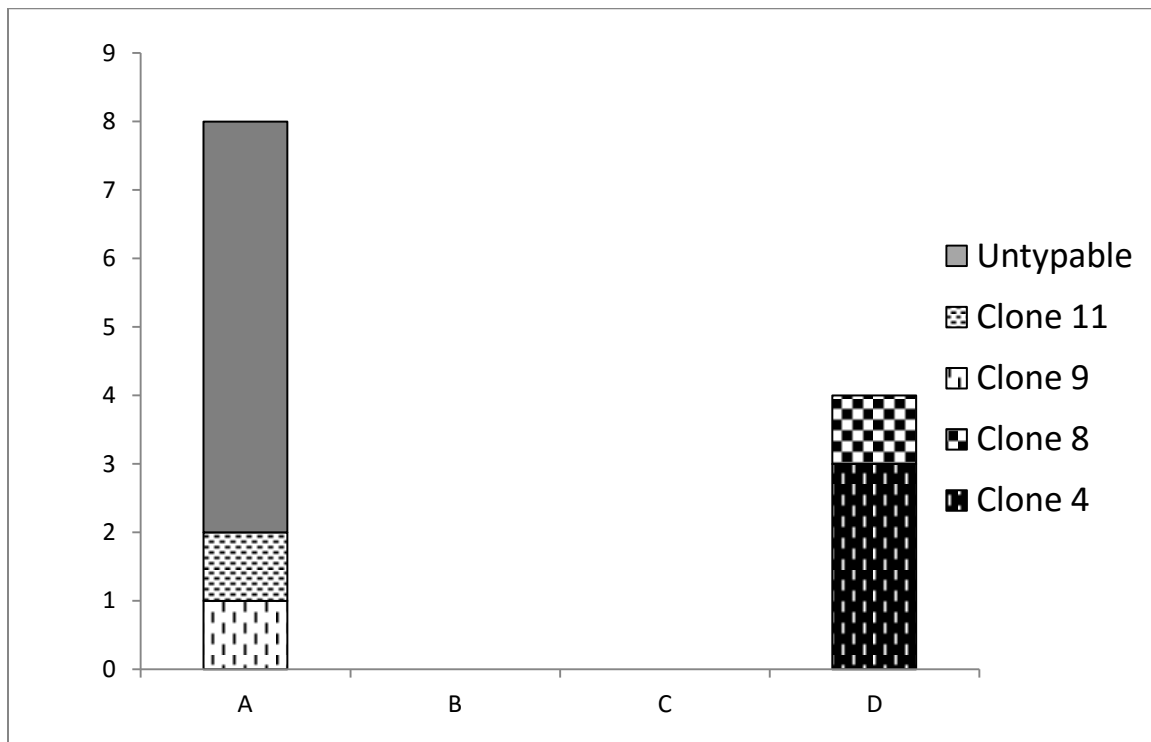




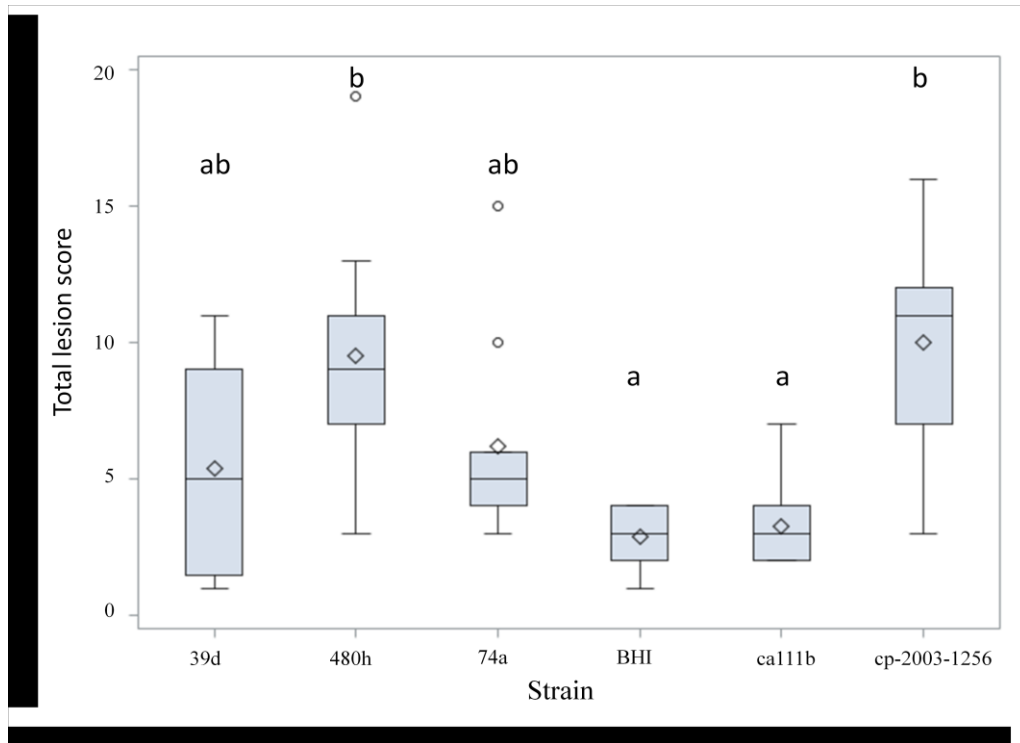
**Figure 4.** *C. perfringens* clones distribution in the 4 consecutive flocks of the NE+ farm.



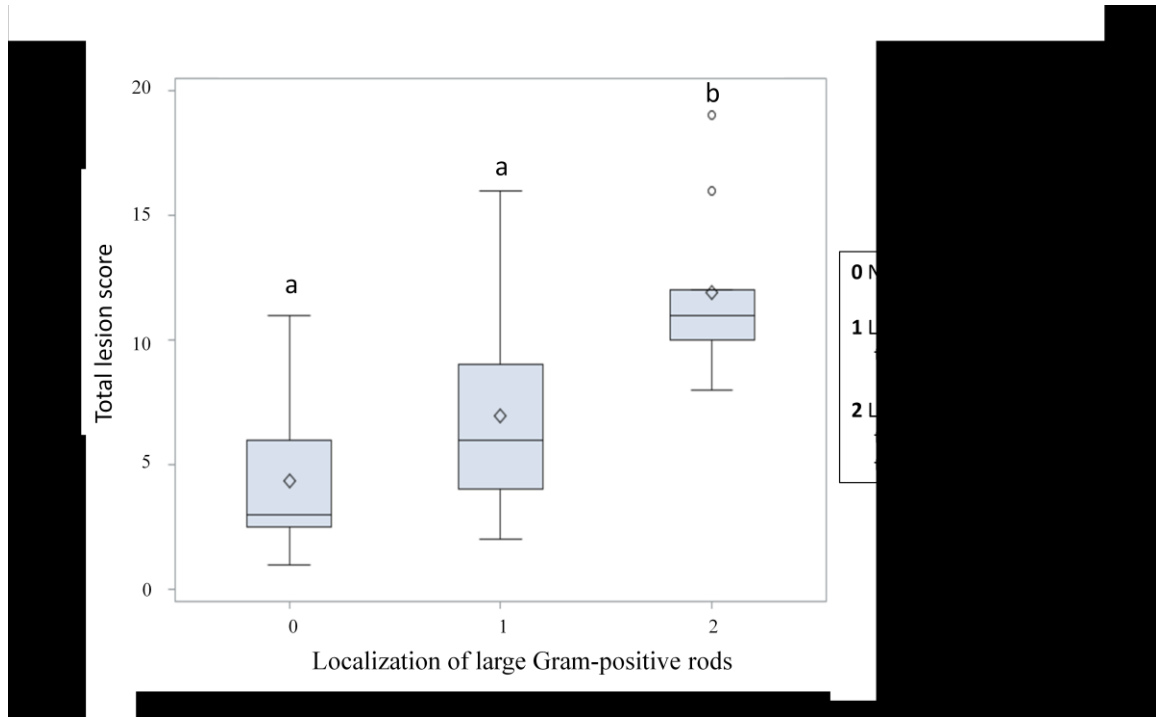
**Figure 5.** *C. perfringens* clones distribution in the 4 consecutive flocks of the NE- farm.



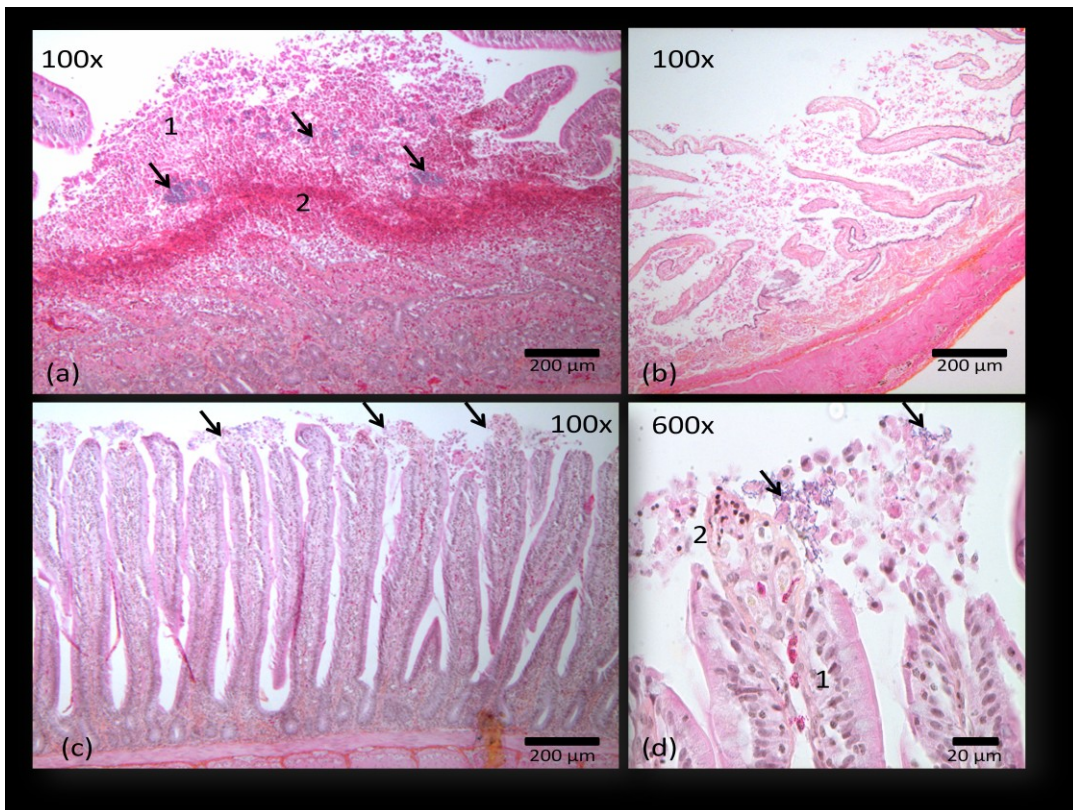
**Figure 6.** Average total lesion scores of the intestinal ligated loop experiment for each inoculated *C. perfringens* strain. Groups were compared using repeated measures ANOVA with Tukey post-hoc test. There are significant differences between groups ( $p < 0.01$ ) where letters above boxplots are different ( $n=9$ ).



**Figure 7.** Average total lesion scores of the intestinal ligated loop experiment by the localization of the Gram-positive bacteria observed at histopathology. Groups were compared using repeated measures ANOVA with Tukey post-hoc test. There are significant differences between groups ( $p < 0.01$ ) where letters above boxplots are different ( $n=9$ ).



**Figure 8.** *Histological lesions of necrotic enteritis 7 hours post-infection produced by various C. perfringens strains in the intestinal ligated loop model. (a) Loop injected with strain 480h. Presence of necrotic tissue (1) with multiple clusters of large Gram-positive rods (arrows). A visible demarcation line (2) including heterophils and erythrocytes was present through the entire segment. (b) Loop injected with strain cp-2003-1256, a positive control strain. Coagulation necrosis of the whole villi covered with a layer of large Gram-positive rods, typical of field cases of necrotic enteritis. No viable cell observed in the mucosa. (c) Loop injected with cp-2003-1256: ulceration of villi tips (arrows). (d) Higher magnification of villi tips necrosis (2) with large Gram-positive rods associated to the necrotic cells of the mucosa (arrows). Degranulating heterophils (1) are present in the lamina propria of villi. HPS stain.*



## Tables

**Table 1.** *Number of isolates recovered per sampled flock over the four consecutive production periods.*

<b>Flock ID</b>	<b>Number of isolates from NE+* farm</b>	<b>Number of isolates from NE-* farm</b>
<b>A</b>	<b>34</b>	<b>8</b>
<b>B</b>	<b>24</b>	<b>0</b>
<b>C</b>	<b>31</b>	<b>0</b>
<b>D</b>	<b>31</b>	<b>4</b>
<b>Total</b>	<b>121</b>	<b>12</b>

\*NE+ and NE- are abbreviations respectively for ‘Farm with necrotic enteritis’ and ‘Farm without necrotic enteritis’.

**Table 2.** *Description of C. perfringens strains selected for the intestinal ligated loop model.*

<b>Strain</b>	<b>PFGE clone</b>	<b>Toxinotype</b>	<b>Farm NE status</b>	<b>cpb2</b>	<b>netB</b>
<b>480h</b>	3	A	NE+	+	+
<b>74a</b>	5	A	NE+	+	+
<b>39d</b>	5	A	NE+	+	-
<b>ca111b</b>	8	A	NE-	-	-
<b>cp-2003-1256</b>	7	A	Control +	-	+
<b>BHI</b>	N/A	N/A	Control -	N/A	N/A

**Table 3.** *Microscopic lesions scoring system. Magnifications for each criteria evaluated are in parentheses.*

<b>Microscopical lesion</b>	<b>Score</b>
<b>Villi fusion (100x)</b>	
No villi fusion	0
1 fusion of 2 villi	1
1 fusion of 3 villi or 2 fusions of 2 villi	2
Fusion of more than 3 villi	3
<b>Red blood cells in gut lumen (100x)</b>	
No erythrocyte observed in lumen	0
1 to 5 small aggregates around villi	1
Large aggregates surrounding 3 villi	2
Large aggregates surrounding all villi	3
<b>Proteinaceous material in gut lumen (100x)</b>	
No proteinaceous observed in lumen	0
1 to 5 small spots around villi	1
Large aggregates surrounding 3 villi	2
Large aggregates surrounding all villi	3
<b>Necrotic material in gut lumen (100x)</b>	
No necrotic material observed in lumen	0
1 to 5 small aggregates around villi	1
Large aggregates surrounding 3 villi	2
Large aggregates surrounding all villi	3
<b>Heterophils in mucosa (400x)</b>	
0 heterophil observed in villi	0
1 to 25 counted heterophils in 1 villus	1
26 to 50 counted heterophils in 1 villus	2
> 50 counted heterophils in 1 villus	3
<b>Epithelial cells defects (400x)</b>	
No damage to the villi and brush borders	0
Loss of brush border of the villus apex	1
Flattening of the villus apex	2
Ulceration of the villus apex	3
Ulceration of half the villus	4
Complete ulceration of the villus	5
<b>Total</b>	<b>20</b>

**Table 4.** *Description of large Gram-positive rods observed by microscopic evaluation of the intestinal loops.*

<b>Large Gram-positive rod localization</b>	<b>Score</b>
No Gram-positive rods observed	0
Gram-positive rods observed in the intestinal content only	1
Gram-positive rods observed in the intestinal content and adhered to the mucosa	2



## Discussion

Pour investiguer davantage les causes d'entérite nécrotique possiblement causées par une population de *C. perfringens* virulente dans la ferme NE+, la confirmation ou l'infirmité de la pathogénicité des clones identifiés au PFGE dans un modèle d'entérite nécrotique était nécessaire (Uzal, *et al.*, 2015). La plupart des modèles utilisent une méthode d'inoculation de bouillons de culture de *C. perfringens per os* (Al-Sheikhly & Truscott, 1977; Bernier, *et al.*, 1977; Chalmers, *et al.*, 2007; Cooper & Songer, 2010; Keyburn, *et al.*, 2006; Lee, *et al.*, 2011), mais ils nécessitent une grande quantité de groupes et d'oiseaux pour permettre la comparaison de la virulence de souches de *C. perfringens* (Smyth & Martin, 2010). De plus, la pathogénicité des souches de *C. perfringens* pourrait être influencée par la présence de facteurs de risque comme une haute dose d'*Eimeria* spp. Ceci pourrait induire des lésions de différentes intensités causées par la coccidiose chez les différents oiseaux et possiblement des lésions variables d'entérite nécrotique. Un modèle standardisant les facteurs de risque serait ainsi à préconiser. Notre modèle de ligatures intestinales en boucles permet d'utiliser un seul facteur de risque qui est stable pour tous les segments intestinaux : une stase intestinale causée par l'utilisation de butorphanol (Bernier, *et al.*, 1977) ainsi que la création de segments intestinaux ligaturés qui empêchent les bactéries injectées de se déplacer dans le tractus gastro-intestinal (Valgaeren, *et al.*, 2013). De plus, l'utilisation de plusieurs souches dans un même oiseau a l'avantage de diminuer la variabilité de la virulence entre oiseaux et ainsi diminuer considérablement le nombre d'oiseaux nécessaires par rapport à des modèles d'inoculation *per os*. Ainsi, les ligatures intestinales en boucles sont mieux

adaptées pour évaluer la virulence de souches de *C. perfringens* par rapport aux modèles *per os*, surtout à cause d'une possible diminution de la variabilité entre les groupes.

L'utilisation de ce nouveau modèle chez le poulet a permis la reproduction de l'entérite nécrotique seulement avec les souches provenant de cas d'entérite nécrotique (480h, troupeau B, ferme NE+; 74a et 39d, troupeau A, ferme NE+; cp-2003-1256, contrôle positif). Aucune lésion microscopique d'entérite nécrotique n'a été observée avec l'utilisation de la souche provenant du troupeau NE- (ca111b, troupeau D, ferme NE-) ou le contrôle négatif (BHI). Ainsi, l'utilisation de souches récupérées d'éclosions d'entérite nécrotique semble essentielle à la reproduction de la maladie dans ce modèle de ligatures intestinales en boucles, comme il est rapporté dans les autres modèles d'entérite nécrotique chez le poulet (Cooper & Songer, 2010; Timbermont, Lanckriet, Gholamiandehkordi, *et al.*, 2009). L'ajout des nombreuses boucles contrôles injectées avec le BHI entre les boucles injectées avec les souches était nécessaire pour vérifier une translocation potentielle des souches injectées entre les différentes boucles, d'autant plus que ce modèle est peu décrit chez le poulet. Les boucles contrôles adjacentes aux boucles inoculées avec des lésions d'entérite nécrotique n'ayant pas montré de lésion d'entérite nécrotique, le modèle a confirmé que plusieurs souches pouvaient être utilisées dans un oiseau. Par contre, l'ensemencement du contenu intestinal des boucles contrôles a montré à de rares occasions l'isolement de quelques colonies de *C. perfringens* (données non montrées). Après analyse moléculaire, ces colonies correspondaient à la souche injectée dans la boucle adjacente. Ainsi, il est possible dans de rares cas que des bactéries passent d'une boucle à l'autre, sans toutefois causer de lésions microscopiques. La faible quantité de bactéries ayant passé dans l'autre boucle à cause d'une ligature non complètement

étanche et le peu de temps pour s'implanter dans le milieu pourraient être des raisons expliquant l'absence de lésions histologiques. Une bonne technique de ligature est donc essentielle pour la validité de ce modèle. Par contre, l'analyse des colonies récupérées des boucles injectées avec une souche de *C. perfringens* a montré que 7 heures post-inoculation, il s'agissait toujours de cette même souche.

Des travaux récents ont montré que le gène *netB* de *C. perfringens* était important pour reproduire l'entérite nécrotique dans les modèles d'infections expérimentales (Keyburn, *et al.*, 2008; Smyth & Martin, 2010). Par contre, la souche 39d, qui est négative pour *netB* et provenant du troupeau A de la ferme NE+, a réussi à induire des lésions typiques d'entérite nécrotique. La création de lésions d'entérite nécrotique par une souche négative pour *netB* a déjà été rapportée dans la littérature (Cooper & Songer, 2010). En comparaison, la souche 74a du même troupeau avec un profil PFGE similaire a montré des niveaux de lésions d'entérite nécrotique microscopiques semblables. D'après des recherches dans la littérature, nos résultats sont les premiers à montrer que deux souches avec deux profils au PFGE similaires, mais une *netB*-négative et l'autre *netB*-positive, peuvent induire des lésions d'entérite nécrotique dans un modèle d'infection expérimentale. Cela suggère fortement que *netB* n'est pas essentiel à la création de dommages intestinaux et que pour certaines souches de *C. perfringens*, des facteurs de virulence outre *netB* pourraient être impliqués dans l'entérite nécrotique. Il serait intéressant d'utiliser la souche 39d pour y inclure le gène *netB* par conjugaison et ainsi vérifier s'il y a modification de la virulence dans le modèle de ligatures intestinales en boucles. Dans le même ordre d'idées, l'inactivation du gène *netB* par la création d'un mutant de la souche 74a permettrait d'évaluer l'importance de ce gène dans la virulence

de cette souche. Ces comparaisons pourraient permettre d'identifier de nouveaux facteurs de virulence chez *C. perfringens* causant l'entérite nécrotique chez le poulet.

Seules les souches 480h et cp-2003-1256 ont montré des pointages lésionnels totaux statistiquement plus élevés que la souche ca111b et le contrôle négatif BHI dans notre modèle de ligatures intestinales en boucles. La souche 480h faisant partie des isolats du clone 3 retrouvés dans trois des quatre périodes de productions étudiées, ceci pose un sérieux problème pour une production durable de poulets élevés sans antibiotique dans une même ferme. En plus d'être le seul clone à montrer une capacité à persister dans les fientes d'oiseaux pour plusieurs périodes consécutives, une souche choisie au hasard parmi ce clone a montré un haut degré de virulence dans notre modèle de ligatures intestinales en boucles. Cependant, aucune différence significative n'a pu être décelée avec notre modèle et notre méthode de pointage lésionnel entre les souches 39d ou 74a et la souche ca111b ou le groupe contrôle négatif et ce même si les premières ont induit des lésions d'entérite nécrotique alors que les deuxièmes n'ont pas montré la capacité d'induire ce type de lésions. Les souches de *C. perfringens* peuvent montrer de la variabilité quant aux niveaux de lésions macroscopiques dans des modèles expérimentaux (Cooper & Songer, 2010; Smyth & Martin, 2010). Or, il est possible que cette variabilité affecte aussi nos analyses de pointages lésionnels microscopiques et ce pourrait être une raison expliquant l'incapacité à discerner certaines souches causant des lésions d'entérite nécrotique par rapport à des souches non virulentes. Cette variation de virulence pourrait être diminuée en utilisant un plus grand nombre d'oiseaux en expérimentation que le nombre utilisé pour cette étude. En effet, 10 oiseaux étaient prévus au départ pour la récolte de données, mais à cause de problèmes de coagulation chez un oiseau pendant les

procédures, des échantillons de seulement 9 oiseaux ont pu être analysés. Une augmentation du nombre d'oiseaux utilisés serait une manière efficace d'augmenter la puissance de l'étude ou de diminuer la variabilité des résultats pour permettre un meilleur discernement de la virulence des souches causant l'entérite nécrotique en comparaison de souches non virulentes dans ce modèle de ligatures intestinales en boucles chez le poulet.

Nos expérimentations ont montré une association positive entre la présence de larges bâtonnets à Gram-positif et la présence de dommages intestinaux sévères dans le modèle de ligatures intestinales en boucles. Puisque nous n'avons fait que des colorations HPS et Good Pasture pour évaluer les segments intestinaux, il est impossible pour l'instant d'affirmer qu'il s'agit de *C. perfringens*, même si ce type de bâtonnet est fortement suggestif de cette bactérie à cause d'une morphologie concordante. Il faudrait utiliser d'autres techniques, par exemple l'immunohistochimie, qui permet à des anticorps fluorescents de se lier spécifiquement à *C. perfringens* pour ainsi confirmer s'il s'agit de cette bactérie dans les lésions histologiques. Il serait possible de réaliser cette technique dans le futur pour améliorer la qualité de nos résultats dans le modèle de ligatures intestinales en boucles. L'observation de cette association permet de suggérer qu'une relation hôte-pathogène, comme l'adhérence de *C. perfringens* aux cellules intestinales de poulets, serait une étape importante dans la pathogenèse de l'entérite nécrotique. Il a déjà été rapporté dans la littérature qu'un contact direct entre *C. perfringens* et des cellules intestinales humaines de type Caco-2 augmentait la production de la toxine  $\beta$  et de la perfringolysine (Ma, *et al.*, 2011; Vidal, *et al.*, 2009) et un tel contact pourrait également être nécessaire pour produire une augmentation de la synthèse de toxines impliquées dans l'entérite nécrotique. De plus, il a été rapporté que le système

de régulation à deux composantes VirR/VirS était requis par *C. perfringens* pour augmenter la production de plusieurs toxines (Ohtani & Shimizu, 2015), dont NetB (Cheung, *et al.*, 2010). Puisque ce type de système de contrôle a besoin d'un stimulus externe pour s'activer, il serait possible que le contact entre *C. perfringens* et les cellules intestinales de poulet soit le stimulus nécessaire pour activer ce système et ainsi augmenter la production de plusieurs toxines, par exemple NetB, causant des lésions nécrotiques dans l'intestin des poulets. L'étude de ces facteurs d'adhérence serait à investiguer davantage pour augmenter les connaissances sur l'association entre l'adhérence de *C. perfringens* et les lésions sévères d'entérite nécrotique observées.

Notre modèle de ligatures intestinales en boucles a permis d'observer des lésions d'entérite nécrotique 7 heures post-inoculation, ce qui est très court par rapport à l'apparition de lésions dans les modèles *per os* où les lésions sont observées quelques jours après l'inoculation (Bélangier, 2008). Cette différence pourrait être la conséquence de l'injection de grandes quantités de bactéries dans un milieu clos et en stase, ce qui pourrait permettre une multiplication rapide des bactéries ainsi qu'un contact rapide entre la muqueuse intestinale et les bactéries. De plus, l'injection de souches en phase de croissance logarithmique pourrait être un élément clé. En effet, lors de la standardisation d'un modèle de ligatures en boucles reproduisant l'entérite nécro-hémorragique chez le bovin, il a été montré que l'injection de souches de *C. perfringens* en phase logarithmique permettait d'obtenir des lésions microscopiques plus sévères et reproductibles par rapport à l'injection des mêmes souches en phase stationnaire (Valgaeren, *et al.*, 2013). L'injection en phase stationnaire pouvait aussi résulter en une incapacité de la souche à causer des lésions intestinales. La production de la plupart des

toxines de *C. perfringens* étant durant la phase logarithmique de croissance de la bactérie (Fernandez-Miyakawa, *et al.*, 2007), il est logique que l'injection pendant cette phase permette une apparition plus rapide de lésions car les bactéries en phase stationnaire se doivent de retourner en phase logarithmique avant de produire à nouveau des toxines.

Même avec des résultats intéressants obtenus avec le modèle de ligatures intestinales en boucles, il possède néanmoins ses limites. En premier, l'utilisation de broches chirurgicales (Hemoclip ®, Teleflex) a été testée pour augmenter la vitesse des procédures. Celles-ci étant longues et larges, elles semblaient compromettre la vascularisation des intestins par une occlusion des vaisseaux sanguins mésentériques. De plus, elles n'étaient pas étanches lors de la standardisation de la méthode et des lésions d'entérite nécrotique pouvaient être observées dans les boucles adjacentes à une boucle injectée par *C. perfringens* (cp-2003-1256, données non montrées). Ainsi, l'utilisation de ligatures avec du fil à suture était nécessaire et ne pouvait pas être substituée par cette autre méthode de ligature. La réalisation de boucles intestinales avec le fil à suture pouvait aussi compromettre la vascularisation, surtout si le mésentère comportait beaucoup de gras car les vaisseaux sanguins mésentériques longeant les intestins étaient difficiles à localiser. Dans certains cas, des dommages microscopiques de nécrose reliés à un manque de vascularisation étaient visibles et la boucle ne pouvait pas être analysée à cause des changements histologiques causés par les procédures chirurgicales. Dans d'autres cas, la vascularisation n'était pas complètement compromise, mais une congestion de la muqueuse intestinale et des autres couches intestinales (sous-muqueuse, musculuse) pouvait être observés sans qu'aucun dommage aux cellules intestinales ne soit observé. Ainsi, pour que ce changement iatrogénique ne soit pas analysé dans nos

pointages lésionnels, le critère de congestion des vaisseaux sanguin présent dans d'autres grilles de pointages lésionnels (Gholamiandehkordi *et al.*, 2007) n'a pas été inclus dans notre grille. Donc, notre grille s'est plutôt concentrée sur les dommages locaux aux cellules de la muqueuse intestinale ainsi qu'au degré d'inflammation dans chacune des boucles plutôt qu'à des changements systémiques comme la congestion des vaisseaux sanguins. Aussi, une infiltration hétérophilique de la séreuse et de la *muscularis externa* étaient fréquemment observée dans toutes les boucles intestinales. Ce changement est fort probablement iatrogénique à cause de la manipulation des intestins lors des procédures chirurgicales ainsi que par les dommages causés par l'injection des inoculas avec une aiguille de calibre 27G. D'après l'évaluation des segments intestinaux, cet artéfact ne semble pas avoir causé de changements au niveau de la muqueuse intestinale. En résumé, le modèle de ligatures intestinales en boucles fournit des résultats intéressant, mais les procédures chirurgicales invasives doivent être réalisées avec soin pour éviter les changements histologiques causés par une congestion vasculaire.

La caractérisation moléculaire des isolats de *C. perfringens* en provenance des deux fermes a permis d'observer des différences importantes en terme de diversité génétique et de prévalence de gènes de toxines. Avec la même technique d'isolement bactérien à partir des fientes d'oiseaux (Gaucher, *et al.*, 2015), dix fois plus d'isolats de *C. perfringens* ont été récupérés dans la ferme NE+ par rapport à la ferme NE-. Ceci indique fortement que les oiseaux de la ferme NE+ devaient excréter une plus grande quantité de *C. perfringens* que ceux de la ferme NE-, ce qui est compréhensible car l'échantillonnage à 21 jours d'âge de la ferme NE+ était dans la période de signes cliniques d'entérite nécrotique.



Une faible diversité génétique a été observée parmi les isolats de la ferme NE+ typés par PFGE. En effet, entre 1 et 5 différents clones ont été observés à chacune des périodes de production parmi la trentaine d'isolats récupérés à chaque période. Cette faible diversité est également rapportée dans la littérature, où peu de clones différents sont normalement identifiés dans un même troupeau avec entérite nécrotique (Chalmers, Bruce, et al., 2008; Engstrom, et al., 2003; Gholamiandekhordi, et al., 2006; Nauerby, et al., 2003). Notre étude va plus loin dans l'étude de la diversité génétique de *C. perfringens* car nous avons fait un suivi des clones pour 4 périodes consécutives sur une même ferme. Ceci nous a permis d'identifier le clone 3 étant présent pour 3 lots consécutifs (périodes A, B et C). Il a été le seul clone à être identifié dans plus d'une période de production. De plus, les clones 1 et 2 identifiés seulement dans le troupeau D avaient 2 fragments de restrictions qui différaient du profil PFGE du clone 3, ce qui en font des clones génétiquement rapprochés d'après les critères de Tenover (Tenover, et al., 1995). Ainsi, il est fort probable qu'une mutation au niveau d'un site de restriction soit survenue, mais en préservant le caractère de virulence du clone 3 puisque le troupeau D était aussi affecté par l'entérite nécrotique et ceci même si les clones identifiés étaient différents que ceux des autres périodes de production. Cependant, seule une infection expérimentale *in vivo* avec les clones 1 et 2 permettrait de déterminer leur virulence, mais la limitation du nombre de souches pouvant être utilisées dans notre modèle de ligatures intestinales en boucle nous a empêchés de les utiliser pour cette étude. Le clone 5 était hautement prévalent dans le troupeau A de la ferme NE+, mais pour une raison inconnue il n'a pas été identifié dans les troupeaux subséquents. Puisque le clone 3 était également présent dans le troupeau A et qu'il a été par la suite le seul identifié pour les troupeaux B

et C, il est possible que ce dernier ait inhibé la croissance des autres clones initialement présents. Ceci est une caractéristique rapportée chez certaines souches de *C. perfringens* virulentes (Barbara, *et al.*, 2008; Timbermont, Lanckriet, Pasmans, *et al.*, 2009). Nos résultats supportent l'hypothèse que la faible diversité génétique de *C. perfringens* dans des troupeaux consécutifs de poulets avec entérite nécrotique serait une conséquence d'une souche persistante dans l'environnement qui pourrait inhiber la croissance d'autres souches de *C. perfringens*. Les interactions entre les souches appartenant à différents clones seraient par contre à étudier, par exemple en administrant des bouillons mixtes de *C. perfringens* à des oiseaux et en suivant les clones excrétés dans les fientes dans le temps ou en faisant des épreuves *in vitro* d'inhibition de la croissance.

Malgré que les troupeaux ne recevaient pas d'antibiotique, le troupeau B de la ferme NE+ a quand même reçu de la pénicilline potassique (Pot-Pen<sup>®</sup>, Vétoquinol) en traitement dans l'eau de boisson entre 31 et 36 jours d'âge à cause de problèmes sévères d'entérite nécrotique qui avaient dépassés les points limites de l'étude. Il est à préciser que l'échantillonnage du troupeau B était à 21 jours, donc le traitement n'a pas eu d'influence sur la diversité génétique ce troupeau. Cette action aurait pu favoriser la sélection de clones de *C. perfringens* résistants à la pénicilline et ainsi diminuer la diversité génétique dans les troupeaux subséquents. Par contre, plusieurs isolats des troupeaux B et C ont été testés et aucun ne s'est montré résistant à la pénicilline (données non montrées). Ainsi, il semble que la pénicilline n'aurait eu aucun effet sur la diversité génétique dans ces troupeaux, d'autant plus que le clone 3 identifié dans le troupeau B était toujours présent dans le troupeau C. De plus, le traitement du troupeau B ne semble

avoir eu aucun effet sur l'apparition de signes cliniques d'entérite nécrotique dans le troupeau C.

La diversité génétique des isolats de *C. perfringens* de la ferme NE- est cependant difficile à évaluer. Premièrement, aucun isolat n'a été isolé des troupeaux B et C, ce qui rend difficile l'analyse de l'évolution de la clonalité dans les troupeaux consécutifs de cette ferme. Dans les troupeaux sans problème d'entérite nécrotique, il est rapporté qu'il peut être difficile d'isoler *C. perfringens* (Chalmers, Martin, et al., 2008) et nos résultats d'isolements bactériens confirment ce qui est présent dans la littérature. Ensuite, seulement 6 des 12 isolats (50%) de la ferme NE- ont pu être typés avec la technique du PFGE et l'enzyme de restriction *smal*, ce qui est un faible taux de réussite. La littérature rapporte plutôt des taux s'approchant de 90% avec l'enzyme *smal* (Engstrom, et al., 2003; Gholamiandekhordi, et al., 2006; Johansson et al., 2006; Nauerby, et al., 2003). À cause de notre technique d'isolement, plusieurs isolats d'une même gélose au sang ont été récupérés (Gaucher, et al., 2015). Or, il est possible que tous ces isolats d'une même gélose puisse être le même clone possiblement non typable, d'autant plus que les 6 isolats non typables ont effectivement été récupérés de la même gélose. Alors que les isolements bactériens dans la littérature prennent peu de colonies bactériennes sur une même gélose, la technique ayant servi à construire la banque de *C. perfringens* de notre étude a pu conduire à l'isolement répété de mêmes souches. Il faudrait par contre confirmer cette hypothèse en utilisant d'autres techniques de typage, par exemple le *multilocus sequence typing* (Chalmers, Bruce, et al., 2008) ou la *multiple-locus variable number of tandem repeats analysis* (Chalmers, Martin, Prescott, et al., 2008; Sawires & Songer, 2005). Malgré le faible taux de typage, les 6 isolats typés ont montré une haute diversité

génétiq ue avec la représentation de 4 différents clones parmi ceux-ci. Ceci est aussi rapporté dans la littérature (Gholamiandekhordi, *et al.*, 2006; Nauerby, *et al.*, 2003). De plus, 2 isolats étaient de type E, c'est-à-dire que le gène *Ia* a été détecté par PCR. Cette trouvaille plutôt rare chez les *C. perfringens* isolés d'oiseaux a aussi été rapportée chez des poulets nourris avec une diète organique (Brady, *et al.*, 2010) et ceci pourrait être une indication de la haute diversité génétique de *C. perfringens* chez des poulets sans problème d'entérite nécrotique.

Le toxinotypage de tous les isolats des deux fermes a aussi permis de révéler des informations intéressantes sur les gènes de toxines présents. Ainsi, nous avons observé une haute prévalence du gène *netB* (95%) parmi les isolats de la ferme NE+ alors que les isolats étaient tous négatifs pour ce gène dans la ferme NE-. Ceci est également rapporté dans la littérature (Johansson, *et al.*, 2010; Keyburn, Yan, *et al.*, 2010; Martin & Smyth, 2009). La toxine NetB étant considérée comme un facteur de virulence important dans l'entérite nécrotique (Keyburn, *et al.*, 2008; Timbermont, *et al.*, 2011), la détection de son gène codant dans la ferme NE+ permet de suggérer que les problèmes d'entérite nécrotique pourrait être causés par une population de *C. perfringens* arborant majoritairement ce gène. Ainsi, peu importe le clone identifié, le gène était majoritairement présent parmi les isolats. Ce gène étant plasmidique (Lepp, *et al.*, 2010) et pouvant être transféré horizontalement par conjugaison (Bannam, *et al.*, 2011), il est fort possible que le gène ait été transféré entre les différents clones de cette ferme. La prévalence de ce gène pourrait être plus élevée car il est possible que le processus d'isolement ait conduit à la perte du plasmide ou que certains isolats aient une variation en nucléotides du gène *netB* dans la région où les amorces s'attachent et ainsi non

délectable au PCR, même si l'isolat pourrait produire la toxine NetB (Martin & Smyth, 2009).

Le toxinotypage a aussi révélé une prévalence du gène *cpb2* de 79% dans la ferme NE+ alors qu'elle était de 25% dans la ferme NE-. Aucune corrélation épidémiologique n'a été établie entre la présence de signes cliniques d'entérite nécrotique et la présence de *cpb2* dans un même troupeau (Crespo, *et al.*, 2007; van Asten, *et al.*, 2010), mais plusieurs auteurs se questionnent sur l'importance de ce gène dans l'entérite nécrotique (Allaart, *et al.*, 2012; Brady, *et al.*, 2010; Cooper, *et al.*, 2010; Martin & Smyth, 2009). L'utilisation de souches virulentes de *C. perfringens* en comparaison de leur mutant ne possédant pas le gène *cpb2* dans un modèle *in vivo* permettrait d'en connaître davantage sur l'implication possible de la toxine  $\beta_2$  dans l'entérite nécrotique puisque seulement des études épidémiologiques ont été réalisées sur le sujet. L'utilisation d'une technique d'immunohistochimie pour démontrer la présence de la toxine dans des lésions intestinales nécrotiques serait aussi essentielle pour affirmer que cette toxine puisse causer des lésions de nécrose intestinale, comme il a déjà été fait pour mettre en cause la toxine  $\beta$  de *C. perfringens* lors d'un cas d'*enteritis necroticans* chez un humain (Matsuda, *et al.*, 2007).

L'objectif général de ce projet était d'investiguer les causes d'entérite nécrotique dans quatre troupeaux consécutifs de poulets d'une même ferme avec entérite nécrotique (NE+) en comparant la virulence des souches de *C. perfringens* récoltées de cette ferme à des souches récoltées d'une ferme sans entérite nécrotique (NE-). Ces fermes faisant partie d'une étude précédente portant sur la faisabilité de l'élevage de poulets sans antibiotique à grande échelle, leur régie avait été ajustée afin d'avoir des pratiques de

production uniformes, sans utilisation d'antibiotique ou d'anticoccidien dans l'alimentation (Gaucher, *et al.*, 2015). Ainsi, l'immunisation contre la coccidiose avec un vaccin vivant atténué administré au couvoir (Coccivac ® B, Merck Animal Health) était pratiquée pour protéger les oiseaux contre la coccidiose, une maladie d'impact économique majeur chez les poulets (Peek & Landman, 2011) et qui prédispose à l'entérite nécrotique (Al-Sheikhly & Al-Saieg, 1980; Williams, *et al.*, 2003). Pour évaluer la qualité de la protection contre cette maladie, l'excrétion d'oocystes par les poulets a été mesurée par des comptes oocytaires dans les fientes fraîches d'oiseaux (Annexe 1). La ferme NE- a montré de faibles pics d'excrétions oocytaires à 18 jours d'âge comparé à l'excrétion oocytaire au même âge chez la ferme NE+ (Annexe 2). Ainsi, les problèmes consécutifs d'entérite nécrotique de cette ferme autour de 21 jours d'âge auraient pu être précipités par des épisodes de coccidiose, ce qui est fréquemment rapporté dans la littérature (Al-Sheikhly & Al-Saieg, 1980; Timbermont, *et al.*, 2011; Williams, *et al.*, 2003). Par contre, le troupeau B de la ferme NE+ a eu des problèmes d'entérite nécrotique clinique même en ayant une courbe d'excrétion oocytaire similaire aux troupeaux de la ferme NE-. Donc, même s'il n'y a pas eu une gestion optimale de la coccidiose dans la ferme NE+ sauf pour le troupeau B, il y avait de fortes raisons de croire que les problèmes liés à cette maladie n'étaient pas seulement liés à la coccidiose, mais également à la virulence des souches de *C. perfringens*. Les résultats de notre modèle de ligatures intestinales en boucle suggèrent également que la virulence des souches de *C. perfringens* des troupeaux avec problèmes d'entérite nécrotique a un rôle majeur dans la pathogénie de la maladie.

## Conclusion

L'élevage de poulets sans antibiotique est un sujet d'actualité qui implique de nombreux intervenants parmi la chaîne de production avicole, allant des producteurs jusqu'aux consommateurs. Des acteurs clés de ce secteur de production comme les médecins vétérinaires, les chercheurs et le personnel impliqué dans l'élevage de poulets, tentent de trouver des solutions à ces maladies en réémergence depuis le retrait des antibiotiques en élevage. Parmi ces maladies se dresse l'entérite nécrotique causée par *C. perfringens*, facteur majeur affectant la santé des troupeaux de poulets élevés sans antibiotique. Les études sur la production avicole sans antibiotique, comme celle réalisée par la Chaire en recherche avicole de l'Université de Montréal, permettent de prendre conscience l'ampleur des problèmes reliés cette maladie.

Le modèle de ligatures intestinales en boucles développé dans cette étude a le potentiel de permettre une étude approfondie de ces facteurs de virulence afin d'atteindre l'objectif d'une production avicole sans antibiotique et sans entérite nécrotique. Le projet de ce mémoire voulait approfondir les causes d'entérite nécrotique récurrente chez une même ferme, afin d'identifier les causes de cette maladie compromettant la production sans antibiotique chez certaines fermes, et non chez d'autres. Ainsi, la comparaison s'est faite à partir de fermes avec des poussins et une alimentation de la même source et une régie similaire. Nous avons remarqué une diversité génétique variant dans le temps avec l'apparition et la disparition de clones dans la ferme NE+. Il semble y avoir un changement de population de *C. perfringens* dans le temps, mais toujours avec un profil clinique d'entérite nécrotique sur la ferme. Donc, même au travers de possibles mutations ou changement de flore, le caractère de virulence des souches de *C. perfringens* semble

se transférer des anciennes aux nouvelles populations et ainsi préserver le profil clinique observé sur la ferme. Ceci est un obstacle majeur à une production à long terme de poulets sans antibiotique sur une même ferme car les problèmes d'entérite nécrotique ne seraient pas nécessairement causés par une seule souche, mais plutôt par plusieurs souches potentiellement virulentes qui pourraient posséder des facteurs de virulence communs. Certains de ces facteurs, dont *netB*, sont maintenant bien connus, mais d'autres facteurs liés à la persistance dans l'environnement, la prédominance de certaines souches virulentes ainsi que l'adhérence aux cellules intestinales demanderaient plus d'attention pour les identifier en premier lieu et ensuite, développer des méthodes de contrôle pour empêcher l'établissement de ces souches virulentes dans l'intestin des oiseaux. Ceci amènerait des outils supplémentaires aux intervenants du milieu avicole pour contrôler l'entérite nécrotique dans un contexte n'utilisant pas d'antibiotique.



## Bibliographie

- Abildgaard, L., Sondergaard, T.E., Engberg, R.M., Schramm, A. & Hojberg, O. (2010). In vitro production of necrotic enteritis toxin B, NetB, by netB-positive and netB-negative *Clostridium perfringens* originating from healthy and diseased broiler chickens. *Vet Microbiol*, 144, 231-235. doi: 10.1016/j.vetmic.2009.12.036
- Al-Sheikhly, F. & Al-Saieg, A. (1980). Role of Coccidia in the occurrence of necrotic enteritis of chickens. *Avian Dis*, 24, 324-333.
- Al-Sheikhly, F. & Truscott, R.B. (1977). The pathology of necrotic enteritis of chickens following infusion of broth cultures of *Clostridium perfringens* into the duodenum. *Avian Dis*, 21, 230-240.
- Allaart, J.G., de Bruijn, N.D., van Asten, A.J., Fabri, T.H. & Grone, A. (2012). NetB-producing and beta2-producing *Clostridium perfringens* associated with subclinical necrotic enteritis in laying hens in the Netherlands. *Avian Pathol*, 41, 541-546. doi: 10.1080/03079457.2012.729809
- Amimoto, K., Noro, T., Oishi, E. & Shimizu, M. (2007). A novel toxin homologous to large clostridial cytotoxins found in culture supernatant of *Clostridium perfringens* type C. *Microbiology*, 153, 1198-1206. doi: 10.1099/mic.0.2006/002287-0
- Annett, C.B., Viste, J.R., Chirino-Trejo, M., Classen, H.L., Middleton, D.M. & Simko, E. (2002). Necrotic enteritis: effect of barley, wheat and corn diets on proliferation of *Clostridium perfringens* type A. *Avian Pathol*, 31, 598-601. doi: 10.1080/0307945021000024544
- Antonissen, G., Van Immerseel, F., Pasmans, F., Ducatelle, R., Haesebrouck, F., Timbermont, L., et al. (2014). The mycotoxin deoxynivalenol predisposes for the development of *Clostridium perfringens*-induced necrotic enteritis in broiler chickens. *PLoS One*, 9, e108775. doi: 10.1371/journal.pone.0108775
- Autheman, D., Wyder, M., Popoff, M., D'Herde, K., Christen, S. & Posthaus, H. (2013). *Clostridium perfringens* Beta-Toxin Induces Necrostatin-Inhibitible, Calpain-Dependent Necrosis in Primary Porcine Endothelial Cells. *PLoS One*, 8, e64644. doi: 10.1371/journal.pone.0064644
- Bactibase. (2013). BACTIBASE: database dedicated to bacteriocins, from <http://bactibase.pfba-lab-tun.org/main.php>
- Baertlein, L. & Huffstutter, P.J. (2015). McDonald's USA to phase out human antibiotics from chicken supply. In *Reuters* U.S. ed. Los Angeles/Chicago: Thomson Reuters.
- Bannam, T.L., Yan, X.X., Harrison, P.F., Seemann, T., Keyburn, A.L., Stubenrauch, C., et al. (2011). Necrotic enteritis-derived *Clostridium perfringens* strain with three closely related independently conjugative toxin and antibiotic resistance plasmids. *MBio*, 2. doi: 10.1128/mBio.00190-11
- Barbara, A.J., Trinh, H.T., Glock, R.D. & Glenn Songer, J. (2008). Necrotic enteritis-producing strains of *Clostridium perfringens* displace non-necrotic enteritis strains from the gut of chicks. *Vet Microbiol*, 126, 377-382. doi: 10.1016/j.vetmic.2007.07.019
- Barth, H. & Stiles, B.G. (2008). Binary actin-ADP-ribosylating toxins and their use as molecular Trojan horses for drug delivery into eukaryotic cells. *Curr Med Chem*, 15, 459-469.
- Bélangier, M. (2008). *Mise au point d'un modèle d'infection expérimentale d'entérite nécrotique clinique chez le poulet de chair par des facteurs prédisposants*.
- Bernier, G., Phaneuf, J.B. & Filion, R. (1977). [Necrotic enteritis in broiler chickens. III. Study of the factors favoring the multiplication of *Clostridium perfringens* and the experimental transmission of the disease]. *Can J Comp Med*, 41, 112-116.
- Bokori-Brown, M., Savva, C.G., Fernandes da Costa, S.P., Naylor, C.E., Basak, A.K. & Titball, R.W. (2011). Molecular basis of toxicity of *Clostridium perfringens* epsilon toxin. *FEBS J*, 278, 4589-4601. doi: 10.1111/j.1742-4658.2011.08140.x
- Brady, J., Hernandez-Doria, J.D., Bennett, C., Guenter, W., House, J.D. & Rodriguez-Lecompte, J.C. (2010). Toxinotyping of necrotic enteritis-producing and commensal isolates of *Clostridium perfringens* from chickens fed organic diets. *Avian Pathol*, 39, 475-481. doi: 10.1080/03079457.2010.521141
- Branton, S.L., Lott, B.D., Deaton, J.W., Maslin, W.R., Austin, F.W., Pote, L.M., et al. (1997). The effect of added complex carbohydrates or added dietary fiber on necrotic enteritis lesions in broiler chickens. *Poult Sci*, 76, 24-28.

- Branton, S.L., Reece, F.N. & Hagler, W.M., Jr. (1987). Influence of a wheat diet on mortality of broiler chickens associated with necrotic enteritis. *Poult Sci*, 66, 1326-1330.
- Brennan, J., Bagg, R., Barnum, D., Wilson, J. & Dick, P. (2001). Efficacy of narasin in the prevention of necrotic enteritis in broiler chickens. *Avian Dis*, 45, 210-214.
- Cavalcanti, M.T.H., Porto, T., Figueiredo Porto, A.L., Brandi, I.V., de Lima Filho, J.L. & Pessoa Junior, A. (2004). Large scale purification of *Clostridium perfringens* toxins: a review. *Brazilian Journal of Pharmaceutical Sciences*, 40.
- CFIA. (2011, 2011-11-28). Guidelines on Natural, Naturally Raised, Feed, Antibiotic and Hormone Claims Retrieved 16 juillet 2013, 2013, from <http://www.inspection.gc.ca/english/fssa/labeti/natall/instrmpanie.shtml>
- Chalmers, G., Bruce, H.L., Hunter, D.B., Parreira, V.R., Kulkarni, R.R., Jiang, Y.F., et al. (2008). Multilocus sequence typing analysis of *Clostridium perfringens* isolates from necrotic enteritis outbreaks in broiler chicken populations. *J Clin Microbiol*, 46, 3957-3964. doi: 10.1128/jcm.01548-08
- Chalmers, G., Bruce, H.L., Toole, D.L., Barnum, D.A. & Boerlin, P. (2007). Necrotic enteritis potential in a model system using *Clostridium perfringens* isolated from field outbreaks. *Avian Dis*, 51, 834-839. doi: 10.1637/7959-022807-REG.1
- Chalmers, G., Martin, S.W., Hunter, D.B., Prescott, J.F., Weber, L.J. & Boerlin, P. (2008). Genetic diversity of *Clostridium perfringens* isolated from healthy broiler chickens at a commercial farm. *Vet Microbiol*, 127, 116-127. doi: 10.1016/j.vetmic.2007.08.008
- Chalmers, G., Martin, S.W., Prescott, J.F. & Boerlin, P. (2008). Typing of *Clostridium perfringens* by multiple-locus variable number of tandem repeats analysis. *Vet Microbiol*, 128, 126-135. doi: 10.1016/j.vetmic.2007.09.018
- Charlebois, A., Jalbert, L.A., Harel, J., Masson, L. & Archambault, M. (2012). Characterization of genes encoding for acquired bacitracin resistance in *Clostridium perfringens*. *PLoS One*, 7, e44449. doi: 10.1371/journal.pone.0044449
- Chen, J., Ma, M., Uzal, F.A. & McClane, B.A. (2014). Host cell-induced signaling causes *Clostridium perfringens* to upregulate production of toxins important for intestinal infections. *Gut Microbes*, 5, 96-107. doi: 10.4161/gmic.26419
- Chen, J., Rood, J.I. & McClane, B.A. (2011). Epsilon-toxin production by *Clostridium perfringens* type D strain CN3718 is dependent upon the agr operon but not the VirS/VirR two-component regulatory system. *MBio*, 2. doi: 10.1128/mBio.00275-11
- Cheung, J.K., Keyburn, A.L., Carter, G.P., Lanckriet, A.L., Van Immerseel, F., Moore, R.J., et al. (2010). The VirSR two-component signal transduction system regulates NetB toxin production in *Clostridium perfringens*. *Infect Immun*, 78, 3064-3072. doi: 10.1128/IAI.00123-10
- Compendium of Veterinary Products. In. (2015). 13th (Canadian Edition) ed. Hensall, ON: North American Compendiums.
- Cooper, K.K. & Songer, J.G. (2009). Necrotic enteritis in chickens: a paradigm of enteric infection by *Clostridium perfringens* type A. *Anaerobe*, 15, 55-60. doi: 10.1016/j.anaerobe.2009.01.006
- Cooper, K.K. & Songer, J.G. (2010). Virulence of *Clostridium perfringens* in an experimental model of poultry necrotic enteritis. *Vet Microbiol*, 142, 323-328. doi: 10.1016/j.vetmic.2009.09.065
- Cooper, K.K., Songer, J.G. & Uzal, F.A. (2013). Diagnosing clostridial enteric disease in poultry. *J Vet Diagn Invest*, 25, 314-327. doi: 10.1177/1040638713483468
- Cooper, K.K., Theoret, J.R., Stewart, B.A., Trinh, H.T., Glock, R.D. & Songer, J.G. (2010). Virulence for chickens of *Clostridium perfringens* isolated from poultry and other sources. *Anaerobe*, 16, 289-292. doi: 10.1016/j.anaerobe.2010.02.006
- Cotter, P.D., Hill, C. & Ross, R.P. (2005). Bacteriocins: developing innate immunity for food. *Nat Rev Microbiol*, 3, 777-788. doi: 10.1038/nrmicro1273
- Coursodon, C.F., Glock, R.D., Moore, K.L., Cooper, K.K. & Songer, J.G. (2012). TpeL-producing strains of *Clostridium perfringens* type A are highly virulent for broiler chicks. *Anaerobe*, 18, 117-121. doi: 10.1016/j.anaerobe.2011.10.001
- Craven, S.E. (2000). Colonization of the intestinal tract by *Clostridium perfringens* and fecal shedding in diet-stressed and unstressed broiler chickens. *Poult Sci*, 79, 843-849.
- Craven, S.E. (2001). Occurrence of *Clostridium perfringens* in the broiler chicken processing plant as determined by recovery in iron milk medium. *J Food Prot*, 64, 1956-1960.

- Craven, S.E., Cox, N.A., Bailey, J.S. & Cosby, D.E. (2003). Incidence and tracking of *Clostridium perfringens* through an integrated broiler chicken operation. *Avian Dis*, 47, 707-711.
- Craven, S.E., Cox, N.A., Stern, N.J. & Mauldin, J.M. (2001). Prevalence of *Clostridium perfringens* in commercial broiler hatcheries. *Avian Dis*, 45, 1050-1053.
- Craven, S.E., Stern, N.J., Bailey, J.S. & Cox, N.A. (2001). Incidence of *Clostridium perfringens* in broiler chickens and their environment during production and processing. *Avian Dis*, 45, 887-896.
- Crespo, R., Fisher, D.J., Shivaprasad, H.L., Fernandez-Miyakawa, M.E. & Uzal, F.A. (2007). Toxinotypes of *Clostridium perfringens* isolated from sick and healthy avian species. *J Vet Diagn Invest*, 19, 329-333.
- Dhillon, A.S., Roy, P., Lauerman, L., Schaberg, D., Weber, S., Bandli, D., et al. (2004). High mortality in egg layers as a result of necrotic enteritis. *Avian Dis*, 48, 675-680.
- Dibner, J.J. & Richards, J.D. (2005). Antibiotic Growth Promoters in Agriculture: History and Mode of Action. *Poult Sci*, 84, 634-643.
- Drew, M.D., Syed, N.A., Goldade, B.G., Laarveld, B. & Van Kessel, A.G. (2004). Effects of dietary protein source and level on intestinal populations of *Clostridium perfringens* in broiler chickens. *Poult Sci*, 83, 414-420.
- El-Rami, F.E., Sleiman, F.T. & Abdelnoor, A.M. (2012). Identification and antibacterial resistance of bacteria isolated from poultry. *Pol J Microbiol*, 61, 323-326.
- Elliott, S.D. & Barnes, E.M. (1959). Changes in serological type and antibiotic resistance of Lancefield group D streptococci in chickens receiving dietary chlortetracycline. *J Gen Microbiol*, 20, 426-433.
- Engstrom, B.E., Fermer, C., Lindberg, A., Saarinen, E., Baverud, V. & Gunnarsson, A. (2003). Molecular typing of isolates of *Clostridium perfringens* from healthy and diseased poultry. *Vet Microbiol*, 94, 225-235.
- Engstrom, B.E., Johansson, A., Aspan, A. & Kaldhusdal, M. (2012). Genetic relatedness and netB prevalence among environmental *Clostridium perfringens* strains associated with a broiler flock affected by mild necrotic enteritis. *Vet Microbiol*, 159, 260-264. doi: 10.1016/j.vetmic.2012.03.024
- Falkow, S. (2004). Molecular Koch's postulates applied to bacterial pathogenicity--a personal recollection 15 years later. *Nat Rev Microbiol*, 2, 67-72. doi: 10.1038/nrmicro799
- Fernandez-Miyakawa, M.E., Marcellino, R. & Uzal, F.A. (2007). *Clostridium perfringens* type A toxin production in 3 commonly used culture media. *J Vet Diagn Invest*, 19, 184-186.
- Freedman, J.C., Theoret, J.R., Wisniewski, J.A., Uzal, F.A., Rood, J.I. & McClane, B.A. (2015). *Clostridium perfringens* type A-E toxin plasmids. *Res Microbiol*, 166, 264-279. doi: 10.1016/j.resmic.2014.09.004
- Fulton, R.M. (2013). Necrotic Enteritis. In M. Boulianne (Ed.), *Avian Disease Manual* 7th ed. pp. 117-118). Florida: American Association of Avian Pathologists, Inc.
- Gaucher, M.L., Quessy, S., Letellier, A., Arsenault, J. & Boulianne, M. (2015). Impact of a drug-free program on broiler chicken growth performances, gut health, *Clostridium perfringens* and *Campylobacter jejuni* occurrences at the farm level. *Poult Sci*. doi: 10.3382/ps/pev142
- George, B.A., Quarles, C.L. & Fagerberg, D.J. (1982). Virginiamycin effects on controlling necrotic enteritis infection in chickens. *Poult Sci*, 61, 447-450.
- Gholamiandehkordi, A.R., Timbermont, L., Lanckriet, A., Van Den Broeck, W., Pedersen, K., Dewulf, J., et al. (2007). Quantification of gut lesions in a subclinical necrotic enteritis model. *Avian Pathol*, 36, 375-382. doi: 10.1080/03079450701589118
- Gholamiandekhordi, A.R., Ducatelle, R., Heyndrickx, M., Haesebrouck, F. & Van Immerseel, F. (2006). Molecular and phenotypical characterization of *Clostridium perfringens* isolates from poultry flocks with different disease status. *Vet Microbiol*, 113, 143-152. doi: <http://dx.doi.org/10.1016/j.vetmic.2005.10.023>
- Gibert, M., Jolivet-Reynaud, C. & Popoff, M.R. (1997). Beta2 toxin, a novel toxin produced by *Clostridium perfringens*. *Gene*, 203, 65-73.
- Gibert, M., Marvaud, J.C., Pereira, Y., Hale, M.L., Stiles, B.G., Boquet, P., et al. (2007). Differential requirement for the translocation of clostridial binary toxins: iota toxin requires a membrane potential gradient. *FEBS Lett*, 581, 1287-1296. doi: 10.1016/j.febslet.2007.02.041
- Gill, D.M. (1982). Bacterial toxins: a table of lethal amounts. *Microbiol Rev*, 46, 86-94.

- Gratia, A. (1925). Sur un remarquable exemple d'antagonisme entre deux souches de colibacille. *CR Soc Biol*, 93, 1040-1041.
- Greenham, L.W., Harber, C., Lewis, E. & Scullion, F.T. (1987). *Clostridium perfringens* in pelleted feed. *Vet Rec*, 120, 557.
- Gurtner, C., Popescu, F., Wyder, M., Sutter, E., Zeeh, F., Frey, J., et al. (2010). Rapid cytopathic effects of *Clostridium perfringens* beta-toxin on porcine endothelial cells. *Infect Immun*, 78, 2966-2973. doi: 10.1128/IAI.01284-09
- Guttenberg, G., Hornei, S., Jank, T., Schwan, C., Lu, W., Einsle, O., et al. (2012). Molecular characteristics of *Clostridium perfringens* TpeL toxin and consequences of mono-O-GlcNAcylation of Ras in living cells. *J Biol Chem*, 287, 24929-24940. doi: 10.1074/jbc.M112.347773
- Harley, J.P., Klein, D.A., Prescott, L.M., Sherwood, L.M., Willey, J.M. & Woolverton, C.J. (2010). La chimiothérapie antimicrobienne. In D. Boeck (Ed.), *Microbiologie De Boeck* ed. Paris: De Boeck.
- Hughes, P. & Heritage, J. Antibiotic Growth-Promoters in Food Animals. *Food and Agriculture Organization of the United Nations*.
- Jack, R.W., Tagg, J.R. & Ray, B. (1995). Bacteriocins of gram-positive bacteria. *Microbiol Rev*, 59, 171-200.
- Jenkins, M., Klopp, S., Ritter, D., Miska, K. & Fetterer, R. (2010). Comparison of Eimeria species distribution and salinomycin resistance in commercial broiler operations utilizing different coccidiosis control strategies. *Avian Dis*, 54, 1002-1006. doi: 10.1637/9137-111109-Reg.1
- Jia, W., Slominski, B.A., Bruce, H.L., Blank, G., Crow, G. & Jones, O. (2009). Effects of diet type and enzyme addition on growth performance and gut health of broiler chickens during subclinical *Clostridium perfringens* challenge. *Poult Sci*, 88, 132-140. doi: 10.3382/ps.2008-00204
- Johansson, A., Aspan, A., Bagge, E., Baverud, V., Engstrom, B.E. & Johansson, K.E. (2006). Genetic diversity of *Clostridium perfringens* type A isolates from animals, food poisoning outbreaks and sludge. *BMC Microbiol*, 6, 47. doi: 10.1186/1471-2180-6-47
- Johansson, A., Aspan, A., Kaldhusdal, M. & Engstrom, B.E. (2010). Genetic diversity and prevalence of netB in *Clostridium perfringens* isolated from a broiler flock affected by mild necrotic enteritis. *Vet Microbiol*, 144, 87-92. doi: 10.1016/j.vetmic.2009.12.017
- Jukes, T.H., Hill, D.C. & Branion, H.D. (1956). Effect of feeding antibiotics on the intestinal tract of the chick. *Poult Sci*, 35, 716-723.
- Kawazoe, U., Bordin, E.L., de Lima, C.A. & Dias, L.A. (2005). Characterisation and histopathological observations of a selected Brazilian precocious line of Eimeria acervulina. *Vet Parasitol*, 131, 5-14. doi: 10.1016/j.vetpar.2005.03.038
- Keyburn, A.L., Bannam, T.L., Moore, R.J. & Rood, J.I. (2010). NetB, a pore-forming toxin from necrotic enteritis strains of *Clostridium perfringens*. *Toxins (Basel)*, 2, 1913-1927. doi: 10.3390/toxins2071913
- Keyburn, A.L., Boyce, J.D., Vaz, P., Bannam, T.L., Ford, M.E., Parker, D., et al. (2008). NetB, a new toxin that is associated with avian necrotic enteritis caused by *Clostridium perfringens*. *PLoS Pathog*, 4, e26. doi: 10.1371/journal.ppat.0040026
- Keyburn, A.L., Portela, R.W., Ford, M.E., Bannam, T.L., Yan, X.X., Rood, J.I., et al. (2013). Maternal immunization with vaccines containing recombinant NetB toxin partially protects progeny chickens from necrotic enteritis. *Vet Res*, 44, 108. doi: 10.1186/1297-9716-44-108
- Keyburn, A.L., Portela, R.W., Sproat, K., Ford, M.E., Bannam, T.L., Yan, X., et al. (2013). Vaccination with recombinant NetB toxin partially protects broiler chickens from necrotic enteritis. *Vet Res*, 44, 54. doi: 10.1186/1297-9716-44-54
- Keyburn, A.L., Sheedy, S.A., Ford, M.E., Williamson, M.M., Awad, M.M., Rood, J.I., et al. (2006). Alpha-toxin of *Clostridium perfringens* is not an essential virulence factor in necrotic enteritis in chickens. *Infect Immun*, 74, 6496-6500. doi: 10.1128/IAI.00806-06
- Keyburn, A.L., Yan, X.X., Bannam, T.L., Van Immerseel, F., Rood, J.I. & Moore, R.J. (2010). Association between avian necrotic enteritis and *Clostridium perfringens* strains expressing NetB toxin. *Vet Res*, 41, 21. doi: 10.1051/vetres/2009069
- Kitadokoro, K., Nishimura, K., Kamitani, S., Fukui-Miyazaki, A., Toshima, H., Abe, H., et al. (2011). Crystal structure of *Clostridium perfringens* enterotoxin displays features of beta-pore-forming toxins. *J Biol Chem*, 286, 19549-19555. doi: 10.1074/jbc.M111.228478

- Lanckriet, A., Timbermont, L., De Gussem, M., Marien, M., Vancraeynest, D., Haesebrouck, F., et al. (2010). The effect of commonly used anticoccidials and antibiotics in a subclinical necrotic enteritis model. *Avian Pathol*, 39, 63-68. doi: 10.1080/03079450903505771
- Lee, K.W., Lillehoj, H.S., Jeong, W., Jeoung, H.Y. & An, D.J. (2011). Avian necrotic enteritis: experimental models, host immunity, pathogenesis, risk factors, and vaccine development. *Poult Sci*, 90, 1381-1390. doi: 10.3382/ps.2010-01319
- Lepp, D., Roxas, B., Parreira, V.R., Marri, P.R., Rosey, E.L., Gong, J., et al. (2010). Identification of novel pathogenicity loci in *Clostridium perfringens* strains that cause avian necrotic enteritis. *PLoS One*, 5, e10795. doi: 10.1371/journal.pone.0010795
- Li, J., Adams, V., Bannam, T.L., Miyamoto, K., Garcia, J.P., Uzal, F.A., et al. (2013). Toxin plasmids of *Clostridium perfringens*. *Microbiol Mol Biol Rev*, 77, 208-233. doi: 10.1128/MMBR.00062-12
- Lindstrom, M., Heikinheimo, A., Lahti, P. & Korkeala, H. (2011). Novel insights into the epidemiology of *Clostridium perfringens* type A food poisoning. *Food Microbiol*, 28, 192-198. doi: 10.1016/j.fm.2010.03.020
- Lovland, A. & Kaldhusdal, M. (1999). Liver lesions seen at slaughter as an indicator of necrotic enteritis in broiler flocks. *FEMS Immunol Med Microbiol*, 24, 345-351.
- Lovland, A. & Kaldhusdal, M. (2001). Severely impaired production performance in broiler flocks with high incidence of *Clostridium perfringens*-associated hepatitis. *Avian Pathol*, 30, 73-81. doi: 10.1080/03079450020023230
- Ma, M., Vidal, J., Saputo, J., McClane, B.A. & Uzal, F. (2011). The VirS/VirR two-component system regulates the anaerobic cytotoxicity, intestinal pathogenicity, and enterotoxemic lethality of *Clostridium perfringens* type C isolate CN3685. *MBio*, 2, e00338-00310. doi: 10.1128/mBio.00338-10
- Manten, A. (1963). The Non-Medical Use of Antibiotics and the Risk of Causing Microbial Drug-Resistance. *Bull World Health Organ*, 29, 387-400.
- Martel, A., Devriese, L.A., Cauwerts, K., De Gussem, K., Decostere, A. & Haesebrouck, F. (2004). Susceptibility of *Clostridium perfringens* strains from broiler chickens to antibiotics and anticoccidials. *Avian Pathol*, 33, 3-7. doi: 10.1080/0307945031000163291
- Martin, T.G. & Smyth, J.A. (2009). Prevalence of netB among some clinical isolates of *Clostridium perfringens* from animals in the United States. *Vet Microbiol*, 136, 202-205. doi: 10.1016/j.vetmic.2008.10.026
- Matsuda, T., Okada, Y., Inagi, E., Tanabe, Y., Shimizu, Y., Nagashima, K., et al. (2007). Enteritis necroticans 'pigbel' in a Japanese diabetic adult. *Pathol Int*, 57, 622-626. doi: 10.1111/j.1440-1827.2007.02149.x
- Maxey, B.W. & Page, R.K. (1977). Efficacy of lincomycin feed medication for the control of necrotic enteritis in broiler-type chickens. *Poult Sci*, 56, 1909-1913.
- Miki, Y., Miyamoto, K., Kaneko-Hirano, I., Fujiuchi, K. & Akimoto, S. (2008). Prevalence and characterization of enterotoxin gene-carrying *Clostridium perfringens* isolates from retail meat products in Japan. *Appl Environ Microbiol*, 74, 5366-5372. doi: 10.1128/aem.00783-08
- Moore, P.R., Evenson, A., Luckey, T.D., McCoy, E., Elvehjem, E.A. & Hart, E.B. (1946). Use of sulphasuccidine, streptothricin and streptomycin in nutrition studies with the chick. *The Journal of Biological Chemistry*, 165, 437-441.
- Morris, W.E. & Fernandez-Miyakawa, M.E. (2009). [Toxins of *Clostridium perfringens*]. *Rev Argent Microbiol*, 41, 251-260.
- Nagahama, M., Michiue, K. & Sakurai, J. (1996). Membrane-damaging action of *Clostridium perfringens* alpha-toxin on phospholipid liposomes. *Biochim Biophys Acta*, 1280, 120-126.
- Nagahama, M., Ochi, S., Oda, M., Miyamoto, K., Takehara, M. & Kobayashi, K. (2015). Recent insights into *Clostridium perfringens* beta-toxin. *Toxins (Basel)*, 7, 396-406. doi: 10.3390/toxins7020396
- Nagahama, M., Ohkubo, A., Kinouchi, Y., Kobayashi, K., Miyamoto, K., Takehara, M., et al. (2015). *Clostridium perfringens* TpeL Induces Formation of Stress Fibers via Activation of RhoA-ROCK Signaling Pathway. *Biol Pharm Bull*, 38, 732-739. doi: 10.1248/bpb.b14-00842
- Nagahama, M., Ohkubo, A., Oda, M., Kobayashi, K., Amimoto, K., Miyamoto, K., et al. (2011). *Clostridium perfringens* TpeL glycosylates the Rac and Ras subfamily proteins. *Infect Immun*, 79, 905-910. doi: 10.1128/iai.01019-10
- Nauerby, B., Pedersen, K. & Madsen, M. (2003). Analysis by pulsed-field gel electrophoresis of the genetic diversity among *Clostridium perfringens* isolates from chickens. *Vet Microbiol*, 94, 257-266.

- NCC. (2012a). Chickopedia: What Consumers Need to Know Retrieved 16 juillet, 2013, from <http://www.nationalchickencouncil.org/about-the-industry/chickopedia/#six>
- NCC. (2012b). U.S. Chicken Industry History Retrieved 15 juillet 2013, 2013, from <http://www.nationalchickencouncil.org/about-the-industry/history/>
- Nishie, M., Nagao, J. & Sonomoto, K. (2012). Antibacterial peptides "bacteriocins": an overview of their diverse characteristics and applications. *Biocontrol Sci*, 17, 1-16.
- Nowell, V.J., Poppe, C., Parreira, V.R., Jiang, Y.F., Reid-Smith, R. & Prescott, J.F. (2010). *Clostridium perfringens* in retail chicken. *Anaerobe*, 16, 314-315. doi: 10.1016/j.anaerobe.2009.11.004
- Ohtani, K., Hayashi, H. & Shimizu, T. (2002). The luxS gene is involved in cell-cell signalling for toxin production in *Clostridium perfringens*. *Mol Microbiol*, 44, 171-179.
- Ohtani, K., Hirakawa, H., Tashiro, K., Yoshizawa, S., Kuhara, S. & Shimizu, T. (2010). Identification of a two-component VirR/VirS regulon in *Clostridium perfringens*. *Anaerobe*, 16, 258-264. doi: 10.1016/j.anaerobe.2009.10.003
- Ohtani, K. & Shimizu, T. (2015). Regulation of toxin gene expression in *Clostridium perfringens*. *Res Microbiol*, 166, 280-289. doi: 10.1016/j.resmic.2014.09.010
- Ohtani, K., Yuan, Y., Hassan, S., Wang, R., Wang, Y. & Shimizu, T. (2009). Virulence gene regulation by the agr system in *Clostridium perfringens*. *J Bacteriol*, 191, 3919-3927. doi: 10.1128/JB.01455-08
- Opengart, K. (2008). Necrotic enteritis. In Y.M. Saif (Ed.), *Diseases of Poultry* 12th ed. pp. 872-879). Iowa: Blackwell Publishing.
- Palliyeguru, M.W., Rose, S.P. & Mackenzie, A.M. (2010). Effect of dietary protein concentrates on the incidence of subclinical necrotic enteritis and growth performance of broiler chickens. *Poult Sci*, 89, 34-43. doi: 10.3382/ps.2009-00105
- Palliyeguru, M.W., Rose, S.P. & Mackenzie, A.M. (2011). Effect of trypsin inhibitor activity in soya bean on growth performance, protein digestibility and incidence of sub-clinical necrotic enteritis in broiler chicken flocks. *Br Poult Sci*, 52, 359-367. doi: 10.1080/00071668.2011.577054
- Paredes-Sabja, D., Sarker, N. & Sarker, M.R. (2011). *Clostridium perfringens* tpeL is expressed during sporulation. *Microb Pathog*, 51, 384-388. doi: 10.1016/j.micpath.2011.05.006
- Pauillac, S., D'Allayer, J., Lenormand, P., Rousselle, J.C., Bouvet, P. & Popoff, M.R. (2013). Characterization of the enzymatic activity of *Clostridium perfringens* TpeL. *Toxicon*. doi: 10.1016/j.toxicon.2013.07.003
- Peek, H.W. & Landman, W.J. (2011). Coccidiosis in poultry: anticoccidial products, vaccines and other prevention strategies. *Vet Q*, 31, 143-161. doi: 10.1080/01652176.2011.605247
- Petit, L., Gibert, M. & Popoff, M.R. (1999). *Clostridium perfringens*: toxinotype and genotype. *Trends Microbiol*, 7, 104-110.
- Petrillo, T.M., Beck-Sague, C.M., Songer, J.G., Abramowsky, C., Fortenberry, J.D., Meacham, L., et al. (2000). Enteritis necroticans (pigbel) in a diabetic child. *N Engl J Med*, 342, 1250-1253. doi: 10.1056/NEJM200004273421704
- Popoff, M.R. (2011). Epsilon toxin: a fascinating pore-forming toxin. *FEBS J*, 278, 4602-4615. doi: 10.1111/j.1742-4658.2011.08145.x
- Prescott, J.F. (1979). The prevention of experimentally induced necrotic enteritis in chickens by avoparcin. *Avian Dis*, 23, 1072-1074.
- Prescott, J.F., Sivendra, R. & Barnum, D.A. (1978). The use of bacitracin in the prevention and treatment of experimentally-induced necrotic enteritis in the chicken. *Can Vet J*, 19, 181-183.
- Rodgers, N.J., Swick, R.A., Geier, M.S., Moore, R.J., Choct, M. & Wu, S.B. (2015). A Multifactorial Analysis of the Extent to Which Eimeria and Fishmeal Predispose Broiler Chickens to Necrotic Enteritis. *Avian Dis*, 59, 38-45.
- Sakurai, J., Nagahama, M. & Oda, M. (2004). *Clostridium perfringens* alpha-toxin: characterization and mode of action. *J Biochem*, 136, 569-574. doi: 10.1093/jb/mvh161
- Sakurai, J., Nagahama, M., Oda, M., Tsuge, H. & Kobayashi, K. (2009). *Clostridium perfringens* iota-toxin: structure and function. *Toxins (Basel)*, 1, 208-228. doi: 10.3390/toxins1020208
- Sawires, Y.S. & Songer, J.G. (2005). Multiple-locus variable-number tandem repeat analysis for strain typing of *Clostridium perfringens*. *Anaerobe*, 11, 262-272. doi: 10.1016/j.anaerobe.2005.03.004
- Shojadoost, B., Vince, A.R. & Prescott, J.F. (2012). The successful experimental induction of necrotic enteritis in chickens by *Clostridium perfringens*: a critical review. *Vet Res*, 43, 74. doi: 10.1186/1297-9716-43-74

- Skinner, J.T., Bauer, S., Young, V., Pauling, G. & Wilson, J. (2010). An economic analysis of the impact of subclinical (mild) necrotic enteritis in broiler chickens. *Avian Dis*, 54, 1237-1240. doi: 10.1637/9399-052110-Reg.1
- Smith, J.A. (2011). Experiences with drug-free broiler production. *Poult Sci*, 90, 2670-2678. doi: 10.3382/ps.2010-01032
- Smyth, J.A. & Martin, T.G. (2010). Disease producing capability of netB positive isolates of *C. perfringens* recovered from normal chickens and a cow, and netB positive and negative isolates from chickens with necrotic enteritis. *Vet Microbiol*, 146, 76-84. doi: 10.1016/j.vetmic.2010.04.022
- Stebbins, M. (2007, 2007). U.S. Government Lists of Bioterrorism Agents and Diseases Retrieved August 12th, 2013, from
- Tenover, F.C., Arbeit, R.D., Goering, R.V., Mickelsen, P.A., Murray, B.E., Persing, D.H., et al. (1995). Interpreting chromosomal DNA restriction patterns produced by pulsed-field gel electrophoresis: criteria for bacterial strain typing. *J Clin Microbiol*, 33, 2233-2239.
- Timbermont, L., De Smet, L., Van Nieuwerburgh, F., Parreira, V.R., Van Driessche, G., Haesebrouck, F., et al. (2014). Perfrin, a novel bacteriocin associated with netB positive *Clostridium perfringens* strains from broilers with necrotic enteritis. *Vet Res*, 45, 40. doi: 10.1186/1297-9716-45-40
- Timbermont, L., Haesebrouck, F., Ducatelle, R. & Van Immerseel, F. (2011). Necrotic enteritis in broilers: an updated review on the pathogenesis. *Avian Pathol*, 40, 341-347. doi: 10.1080/03079457.2011.590967
- Timbermont, L., Lanckriet, A., Gholamiandehkordi, A., R.Pasmans, F., Martel, A., Haesebrouck, F., et al. (2009). Origin of *Clostridium perfringens* isolates determines the ability to induce necrotic enteritis in broilers. *Comp Immunol Microbiol Infect Dis*, 32, 503-512. doi: 10.1016/j.cimid.2008.07.001
- Timbermont, L., Lanckriet, A., Pasmans, F., Haesebrouck, F., Ducatelle, R. & Van Immerseel, F. (2009). Intra-species growth-inhibition by *Clostridium perfringens* is a possible virulence trait in necrotic enteritis in broilers. *Vet Microbiol*, 137, 388-391. doi: 10.1016/j.vetmic.2009.01.017
- Tremblay, C.L., Letellier, A., Quessy, S., Boulianne, M., Daignault, D. & Archambault, M. (2011). Multiple-antibiotic resistance of *Enterococcus faecalis* and *Enterococcus faecium* from cecal contents in broiler chicken and turkey flocks slaughtered in Canada and plasmid colocalization of tetO and ermB genes. *J Food Prot*, 74, 1639-1648. doi: 10.4315/0362-028X.JFP-10-451
- Urbina, P., Flores-Diaz, M., Alape-Giron, A., Alonso, A. & Goni, F.M. (2009). Phospholipase C and sphingomyelinase activities of the *Clostridium perfringens* alpha-toxin. *Chem Phys Lipids*, 159, 51-57. doi: 10.1016/j.chemphyslip.2009.02.007
- Uzal, F.A., McClane, B.A., Cheung, J.K., Theoret, J., Garcia, J.P., Moore, R.J., et al. (2015). Animal models to study the pathogenesis of human and animal *Clostridium perfringens* infections. *Vet Microbiol*. doi: 10.1016/j.vetmic.2015.02.013
- Valgaeren, B., Pardon, B., Goossens, E., Verherstraeten, S., Schauvliege, S., Timbermont, L., et al. (2013). lesion development in a new intestinal loop model indicates the involvement of a shared *Clostridium perfringens* virulence factor in haemorrhagic enteritis in calves. *J Comp Pathol*, 149, 103-112. doi: 10.1016/j.jcpa.2012.11.237
- van Asten, A.J., Nikolaou, G.N. & Grone, A. (2010). The occurrence of cpb2-toxigenic *Clostridium perfringens* and the possible role of the beta2-toxin in enteric disease of domestic animals, wild animals and humans. *Vet J*, 183, 135-140. doi: 10.1016/j.tvjl.2008.11.005
- Van der Sluis, W. (2000). Clostridial enteritis is an often underestimated problem. In *World Poultry* pp. 42-43).
- Van Immerseel, F., De Buck, J., Pasmans, F., Huyghebaert, G., Haesebrouck, F. & Ducatelle, R. (2004). *Clostridium perfringens* in poultry: an emerging threat for animal and public health. *Avian Pathol*, 33, 537-549. doi: 10.1080/03079450400013162
- Van Immerseel, F., Rood, J.I., Moore, R.J. & Titball, R.W. (2009). Rethinking our understanding of the pathogenesis of necrotic enteritis in chickens. *Trends Microbiol*, 17, 32-36. doi: 10.1016/j.tim.2008.09.005
- Veshnyakova, A., Protze, J., Rossa, J., Blasig, I.E., Krause, G. & Piontek, J. (2010). On the interaction of *Clostridium perfringens* enterotoxin with claudins. *Toxins (Basel)*, 2, 1336-1356. doi: 10.3390/toxins2061336
- Vidal, J.E., Ma, M., Saputo, J., Garcia, J., Uzal, F.A. & McClane, B.A. (2012). Evidence that the Agr-like quorum sensing system regulates the toxin production, cytotoxicity and pathogenicity of

- Clostridium perfringens* type C isolate CN3685. *Mol Microbiol*, 83, 179-194. doi: 10.1111/j.1365-2958.2011.07925.x
- Vidal, J.E., Ohtani, K., Shimizu, T. & McClane, B.A. (2009). Contact with enterocyte-like Caco-2 cells induces rapid upregulation of toxin production by *Clostridium perfringens* type C isolates. *Cell Microbiol*, 11, 1306-1328. doi: 10.1111/j.1462-5822.2009.01332.x
- Vidal, J.E., Shak, J.R. & Canizalez-Roman, A. (2015). The CpAL quorum sensing system regulates production of hemolysins CPA and PFO to build *Clostridium perfringens* biofilms. *Infect Immun*, 83, 2430-2442. doi: 10.1128/IAI.00240-15
- Wells, C.L. & Wilkins, T.D. (1996). Clostridia: Sporeforming Anaerobic Bacilli. In S. Baron (Ed.), *Medical Microbiology* 4th ed. Galveston (TX).
- Wicker, D.L., Iscrigg, W.N. & Trammell, J.H. (1977). The control and prevention of necrotic enteritis in broilers with zinc bacitracin. *Poult Sci*, 56, 1229-1231.
- Williams, R.B., Marshall, R.N., La Ragione, R.M. & Catchpole, J. (2003). A new method for the experimental production of necrotic enteritis and its use for studies on the relationships between necrotic enteritis, coccidiosis and anticoccidial vaccination of chickens. *Parasitol Res*, 90, 19-26. doi: 10.1007/s00436-002-0803-4



## Annexe 1

CHAIRE EN RECHERCHE AVICOLE  
Faculté de médecine vétérinaire



Université   
de Montréal

### Comptes séquentiels d'ocystes - Méthodologie pour la collecte des fientes -

Les comptes séquentiels d'ocystes sont essentiels pour mieux comprendre le cycle de la coccidiose dans votre poulailler. Il s'agit de prendre des échantillons de fientes fraîches à tous les 3 jours pendant la durée de l'élevage des oiseaux et en fin d'élevage d'acheminer le tout au Service diagnostic (laboratoire de parasitologie) de la Faculté de médecine vétérinaire pour analyses. On obtient ainsi une courbe qui nous permet entre autre d'identifier le moment où le pic d'infection survient et grâce au différentiel, quelle coccidie est la plus prévalente.

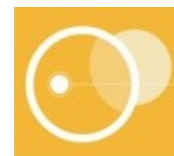
#### Procédure :

- Identifier un sac de type Whirlpak :
  - Nom de la ferme
  - Numéro du poulailler
  - Date d'échantillonnage
  - Age des oiseaux
- Ramasser 15 à 20 fientes fraîches par poulailler lors de la visite (ou du train) un peu partout dans les parquets du poulailler et les mettre dans votre sac identifié.
- Mettre le sac au réfrigérateur
- Fréquence des échantillonnages
  - A partir de 7 jours d'âge
  - Tous les 3 jours pour le reste de l'élevage
- À la fin de l'élevage prendre tous les sacs identifiés et les faire parvenir à l'adresse indiquée ci-bas
- Veuillez dans votre envoi :
  - Identifier le soumissionnaire et le troupeau
  - Donner les informations concernant le programme préventif pour la coccidiose. (nom du vaccin coccidiose ou nom des anticoccidiens utilisés pour les différentes diètes)
  - Et ajouter si possible, lorsqu'une balance électronique est disponible, l'information concernant le poids à différents âges, soit à 7 jours, aux changements de moulée ou aux semaines (14, 21 et 28 jours) et le poids final.

Adresse Laboratoire de parasitologie (local 1204)  
Faculté de médecine vétérinaire  
Université de Montréal

Adresse de livraison :  
3200, rue Sicotte  
Saint-Hyacinthe (Québec) J2S 2M2

Adresse postale  
CP 5000  
Saint-Hyacinthe (Québec) J2S 7C6



## Annexe 2

